

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

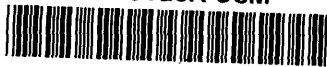
**Mecanismo de acción de antibióticos inhibidores de  
biosíntesis de proteínas en bacterias : su interacción con el  
centro peptidiltransferasa del ribosoma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Rafael Fernández Muñoz**

**Madrid, 2015**

BIBLIOTECA UCM



5305312041

T615.33

FER

mec

Exponente: Sr. Dr. ....

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. ....

Vocal: Sr. Dr. ....

Vocal: Sr. Dr. ....

Vocal: Sr. Dr. ....

Secretario: Sr. Dr. ....

MECANISMO DE ACCION DE ANTIBIOTICOS INHIBIDORES DE BIOSINTESIS

DE PROTEINAS EN BACTERIAS: SU INTERACCION CON EL CENTRO

PEPTIDILTRANSFERASA DEL RIBOSOMA

TESIS presentada para optar al grado de  
DOCTOR EN FARMACIA de la Universidad de  
Madrid, Facultad de Farmacia, por

Jose Rafael Fernandez Muñoz



K.- 20.154

Instituto de Biología Celular  
Patronato Santiago Ramón y Cajal  
C.S.I.C.  
Madrid

En primer lugar mi agradecimiento al Dr. D. Vázquez por la dirección de esta tesis, así como a los Drs. R.E. Monro y R. Torres-Pinedo, por su ayuda durante la realización de la misma.

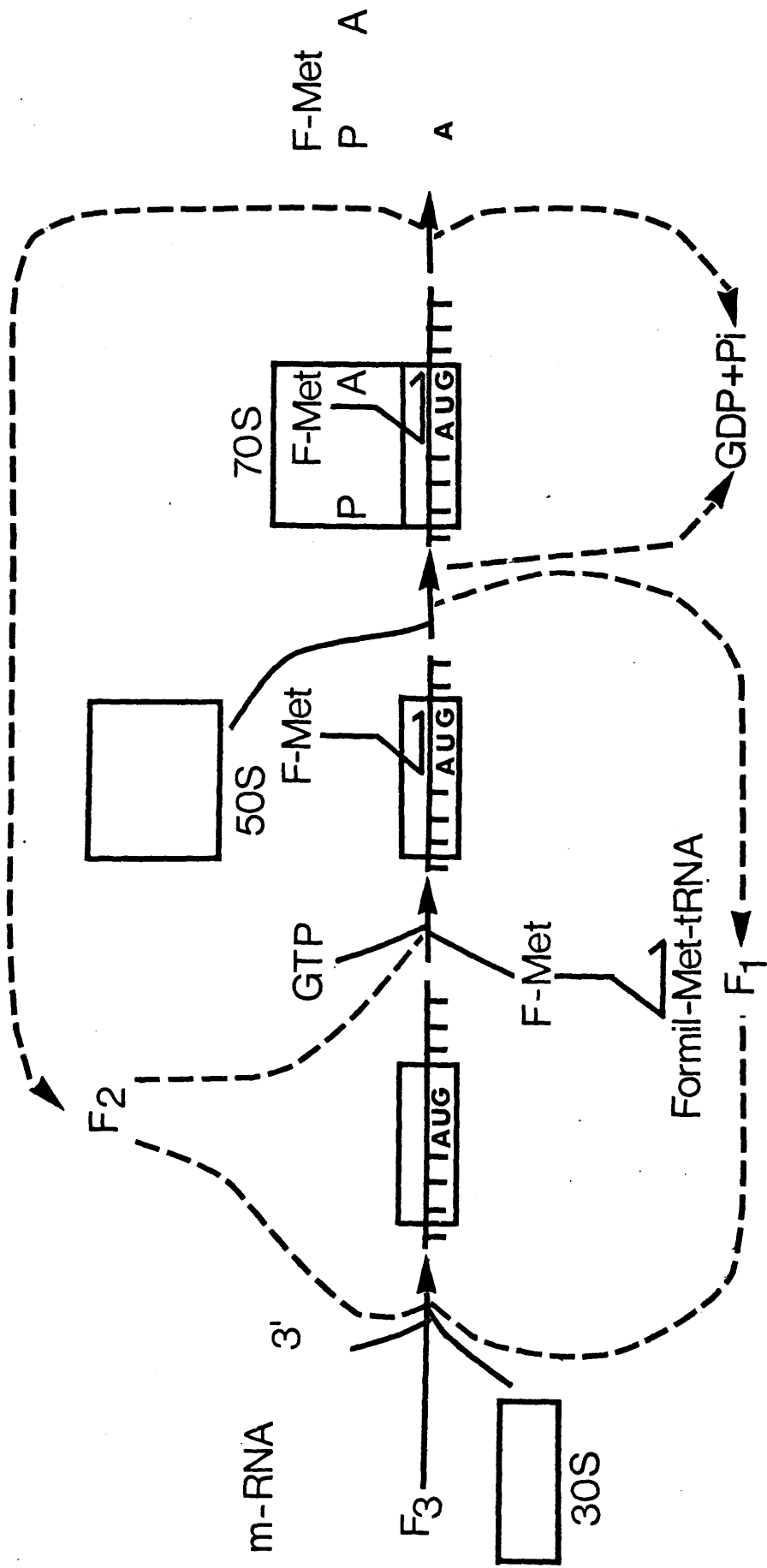
Quiero también expresar mi gratitud a todos mis compañeros de laboratorio, así como la excelente asistencia técnica de las Srtas. Rosario Gutiérrez y Pilar Ochoa.

Este trabajo ha sido llevado a cabo con ayuda del "Plan de Formación del Personal Investigador".

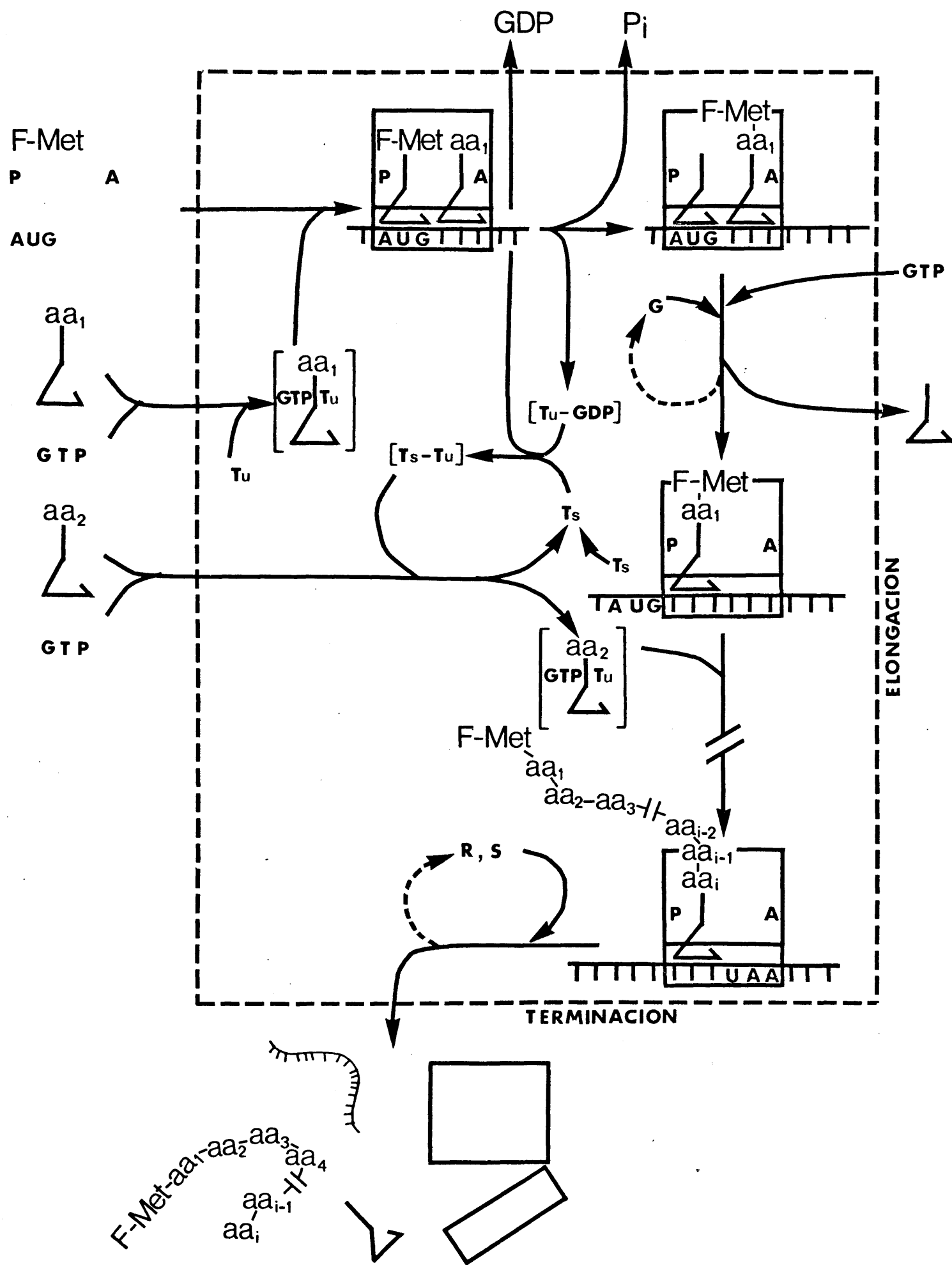
## I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION .....	I
METODOS Y MATERIALES .....	
Metodos analíticos .....	33
Metodos de fijación, diálisis en equilibrio .....	35
Metodo de ultracentrifugación .....	39
Metodo de fijación por filtración .....	44
Metodo de ultrafiltración a presión por membrana	
Diaflo .....	46
Metodo de sedimentación para soluciones con etanol..	51
Cálculos .....	56
Ensayo de reacción de fragmento .....	62
Metodo de incorporación de fenilalanina en	
sistema S100 de E. Coli .....	64
Metodos preparativos:	
Preparación de ribosomas de E. Coli .....	65
Preparación de subunidades ribosómicas 50 S.....	68
Preparación de ribosomas de B. Subtilis .....	70
Preparación de ribosomas de Anacystis Montana .....	71
Estado de agregación de los ribosomas en las	
condiciones iónicas standard .....	72
Preparación de Leu-tRNA y fenilalanil-tRNA .....	73
Preparación de CACCA-Leu-Ac .....	76
Materiales .....	80
Abreviaturas empleadas .....	82
RESULTADOS Y DISCUSION .....	
Capítulo I. Fijación de cloranfenicol a ribosomas	
de E. Coli, B. Subtilis y Anacystis Montana .....	85
Efecto de lincomicina en la fijación de cloranfe-	
nicol a ribosomas de E. Coli .....	91
Interacción de eritromicina con la fijación de	
cloranfenicol .....	93

	Pág.
Efecto de puromicina en fijación de cloranfenicol .	95
Fijación de <sup>14</sup> C cloranfenicol a ribosomas de Bacillus Subtilis .....	101
Fijación de <sup>14</sup> C cloranfenicol a ribosomas de Anacystis Montana .....	102
Capítulo II. Fijación de lincomicina a ribosomas de E. Coli, B. Subtilis y A. Montana .....	104
Efecto de cloranfenicol en fijación de lincomicina.	108
Efecto de eritromicina sobre fijación de lincomicina .....	110
Acción de puromicina sobre fijación de lincomicina.	110
Efecto de una serie de inhibidores de biosíntesis de proteínas sobre fijación de lincomicina .....	112
Actividad in vitro de lincomicina y algunos aná- logos sobre sistemas de E. Coli. Posible razón de su diferente actividad in vivo .....	115
Capítulo III. Fijación de puromicina a ribosomas E.Coli	124
Efecto de antibióticos en la fijación de puromicina a ribosomas de E. Coli .....	128
Estudio cinético sobre reacción de fragmento (CACCA-Leu-Ac) con puromicina .....	133
Inhibición de cloranfenicol respecto a puromicina en reacción de fragmento .....	139
Capítulo IV. Fijación de los macrólidos: Estudio de interacción de eritromicina y espiramicina con ribosomas de E. Coli. Fijación de ( <sup>14</sup> C) eritromicina	
Fijación de ( <sup>14</sup> C) espiramicina I .....	142
Efecto de cloranfenicol en fijación de eritromicina	151
Efecto de lincomicina sobre fijación de eritromicina .....	153
Efecto de puromicina en fijación de eritromicina ..	154
Efecto de una serie de inhibidores de biosíntesis de proteínas en la fijación de eritromicina a ribosomas de E. Coli .....	155
CONCLUSIONES .....	159
BIBLIOGRAFIA .....	165



INICIACION



## Introducción

Uno de los instrumentos más útiles para el conocimiento del proceso de síntesis de proteínas junto con la aplicación de mutantes para distintas funciones y el desarrollo de sistemas in vitro más controlables es la aplicación de inhibidores específicos de los distintos pasos. La capacidad analítica de estos inhibidores aumenta con el conocimiento del mecanismo de su modo de acción y en el caso de que estos antibióticos posean la cualidad de poderse emplear en clínica, el interés de este conocimiento se extiende al esclarecimiento de su especificidad de acción, naturaleza de las resistencias, antagonismo con otros antibióticos, acciones secundarias, causa de distinta actividad de análogos, entre otros puntos de aplicación. En último término, el conocimiento del sustrato o parte del mismo con el que compite o de la naturaleza del sitio de la macromolécula cuya función bloquea, permitirá el planificar la modificación de su molécula en orden a una mayor eficacia.

En este trabajo estudiaremos varios antibióticos de los distintos grupos que inhiben biosíntesis de proteínas en el ribosoma. Comenzaremos por hacer una breve descripción de los hechos actualmente conocidos en bacterias sobre la traducción del mensaje genético en proteínas de secuencia determinada por la del mRNA mensajero (mRNA) -



transcrito del DNA. (revisiones de Lengyel y Söll, 1969; Lipmann, - 1969; Chapeville y Haenni 1969; Nomura 1970). Es sabido que los aminoácidos para su incorporación en las proteínas han de activarse - energéticamente y unirse a un RNA de transferencia (tRNA) específico que les conferirá selectividad respecto a su ordenación frente al - mRNA. (Watson, 1964). Estas reacciones se catalizan por enzimas, aminoacil sintetasas, a partir de tRNA, aminoácido y ATP, que muestran alta especificidad tanto para el tRNA como para el aminoácido en alto grado.

El mecanismo y requerimientos de estas reacciones no estan del todo esclarecidos,. El proceso de incorporación de los aminoácidos - desde el tRNA a la cadena peptídica se sabe requiere además de los - aminoacil tRNA, del mRNA y ribosomas el aporte de GTP y de una serie de factores proteicos que activan determinadas funciones del mismo. (Leugyel 1969). Generalmente esta parte del proceso se divide en las tres denominadas iniciación, alargamiento y terminación.

La iniciación comprende la unión al ribosoma del primer aminoácido hasta que se sitúa en la posición correcta para reaccionar con el siguiente aminoacil tRNA. Se sabe que en bacterias el aminoácido que comienza la proteína es metionina formilada en su  $\text{NH}_2$  para lo cual el aminoácido es necesario se halle unido a un tRNA de los dos que - se conocen para el mismo cuya estructura se lo permita ( $\text{Met-tRNA}_F$ ).

Es sabido también que para que haya iniciación con mRNA naturales se necesita que este tenga el triplete AUG de metionina, aunque no es suficiente. Así mismo intervienen que se conozcan tres factores de iniciación ( $F_I$   $F_2$   $F_3$  Wahba y col. 1969). Se ha demostrado que es necesaria la separación del ribosoma 70S, en sus subunidades 50S y 30S para que tenga lugar la iniciación. (Nomura, Lowry y Guthrie 1967). Previamente se forma un complejo entre mRNA y 30S (Guthrie y Nomura 1968), cuya formación es activada por el factor de iniciación  $F_2$  y no se sabe si  $F_I$ . (Sabol, Sillero, Imasaki y Ochoa 1970; Revel y col. 1970). A este complejo se une f-metionil-tRNA<sub>f</sub> mediante la activación del factor  $F_2$  y GTP. (Herzberg, Lelong y Revel 1969). Así constituido el complejo iniciador se une la subunidad 50S, desprendiéndose los factores  $F_I$  y  $F_2$  a la vez que hay hidrólisis de GTP (Thach y Thach 1971).

El factor de iniciación  $F_3$  sólo se requiere para el reconocimiento de zonas iniciadoras en mensajeros naturales, no en mRNA sintéticos; para que se produzca iniciación en estos mRNA naturales además de la presencia de codon AUG parece necesitarse una determinada estructura secundaria en la zona del mRNA que lo lleva, la cual tiene selectividad hacia el factor  $F_3$  y la subunidad 30S. (Revel y col. 1970; Lodish 1970; Szer y Brenowitz 1970).

El complejo (Fmet-tRNA-Ribosoma-mRNA) fija entonces un nuevo a-

minoacil tRNA (aa-tRNA) codificado por el siguiente triplete con la colaboración de dos factores de la fracción soluble,  $T_S$  y  $T_U$ , y GTP que se hidroliza. El mecanismo de esta fijación no está totalmente esclarecido, pero parece tener lugar a través de un complejo  $T_U$ -GTP-aa-tRNA. Como resultado neto se fija aa-tRNA que reacciona con Fmet-tRNA en reacción catalizada por el enzima peptidiltransferasa del ribosoma, transfiriéndose Fmet del tRNA al grupo  $NH_2$  de aa-tRNA dando Fmet-aa-tRNA a la vez que se desprende GDP- $T_U$ . El factor  $T_S$  tiene la capacidad de regenerar la formación del complejo  $T_U$ -GTP-aa-tRNA de -GDP- $T_U$ , aa-tRNA y GTP, quizás por medio de  $T_S$ - $T_U$ , aislado in vitro - Met-tRNA<sub>F</sub> no se ha encontrado capaz de formar el complejo  $T_U$ -GTP-Met-tRNA<sub>F</sub>. Para otros autores podría haber además otras fijaciones simultáneas de aa-tRNA (Swan y col. 1969) sin embargo es generalmente acceptado que existen dos sitios para fijación de peptidil-tRNA y aa-tRNA (Leder, Skoogerson y Roufa 1969).

El paso de formación de enlace peptídico y las técnicas para su estudio las comentaremos con algo más de extensión por ser parte del objeto de este trabajo.

Una vez transferido, Fmet de Fmet-tRNA a aa-tRNA tiene lugar una serie de fenómenos englobados bajo el nombre de translocación que requieren GTP que se hidrolizará, y el factor G de la fracción soluble que cataliza esa hidrólisis e interacciona directamente con la subu-

nidad 50S; como resultado se tiene la expulsión de tRNA que portaba Fmet, y el desplazamiento del mRNA un triplete de bases en la dirección 5'-3' respecto del ribosoma. Este nuevo complejo es capaz de unir el aa-tRNA codificado por el triplete adyacente en la misma forma, y de esta forma por repetición periódica de estos pasos iría creciendo la cadena peptídica.

Existen diversas teorías sobre la facultad de fijar aa-tRNA y peptidil-tRNA de los sitios ribosómicos. Para algunos autores (Woese 1968) el ribosoma tendría dos sitios simétricos capaces ambos según su conformación de portar peptidil-tRNA o aa-tRNA reconociendo a éste a su vez por la conformación de la zona que porta el anticodon. Generalmente aceptado es el modelo general de traslocación (Watson - 1964) que supone que existen dos sitios, donador y aceptor, asimétricos capaces de fijar cada uno de ellos peptidil-tRNA y aa-tRNA específicamente. Con estas premisas después de cada formación de enlace peptídico se produciría un desplazamiento del ribosoma respecto al mRNA, de modo que tRNA deacilado se expulsaría y peptidil-tRNA que pasaría del sitio aceptor al donador, quedando libre aquel para recibir a un nuevo aa-tRNA. Sobre el modo de como se produce este desplazamiento se sabe muy poco habiéndose formulado distintas teorías basadas en su mayor parte en especulaciones tales son la de Bretsher - (1968) o el de Spirin (1969).

La cadena peptídica mediante la repetición de estas etapas va así incorporando nuevos aminoácidos hasta que en su desplazamiento con respecto al mRNA los ribosomas encuentran una señal de terminación y se produce la hidrólisis del enlace éster entre el péptido y tRNA, desprendiéndose ambos del ribosoma. (Lengyel 1969). En cuanto a la señal de terminación parece ser al menos necesaria la presencia en el mRNA de un triplete sin sentido, es decir que no codifique ningún aminoácido tales como UAA, UAG y UGA, aunque no se sabe si existen otros requerimientos en la estructura de aquel (Nichols 1970).

Para la hidrólisis de peptidil-tRNA se requiere la acción de algunas proteínas de la fracción soluble  $R_I$  para UAA y UAG y  $R_2$  para UAA y UGA por los que presentan afinidad. Así mismo se ha encontrado un factor denominado S que estimula la afinidad  $R_I$  y  $R_2$  por los tripletes correspondientes (Caskey y col. 1969; Cappechi y Klein 1970). El que en los sistemas in vitro empleados para terminación peptidil-tRNA se encuentre en sitio donador, que sea inhibida por inhibidores de peptidiltransferasa, que exista correlación entre la desactivación y reactivación de ambas funciones (Vogel, Zamir y Elson, 1969), junto con que peptidiltransferasa pueda catalizar enlace éster (Fahnestock Neumann, Shashow y Rich 1970) indican que ésta hidrólisis sea producida por la misma:

En cuanto al desprendimiento de tRNA deacilado se ha indicado -

que sería activada por otro factor proteico distinto del G, que no re quiere GTP. (Kaji y col. 1969). En la terminación el ribosoma se se para del mRNA, aunque no se sabe si lo hacen como 70S que más tarde se disociarán mediante un factor de disociación que permanecería uni do a 30S, parece ser que es el  $F_3$  de iniciación (Subramanian, Davis y Beller, 1969) (Subramanian y Davis 1970) o bien que lo hicieran co mo 50S y 30S separados los cuales podrían asociarse para dar una re serva de 70S. (Mangiarolti y Schlessinger 1966; Nomura 1970).

Nosotros en este trabajo hemos relacionado la acción de los an tibióticos estudiados con la formación de enlace peptídico, reacción que es catalizada por la subunidad 50S del ribosoma. (Monro, Staehelin Celma y Vázquez 1969). Para el estudio de elongación de cadena pepti dica fue importante la simplificación introducida por los sistemas - que emplean en RNA sintéticos, (Nirenberg y Matthei 1961) con los - cuales se descifró la clave del mensaje genético. Sin embargo el estu dio de la formación de enlace peptídico separado del resto del proce so no fue posible hasta que se aplicó al mismo el antibiótico puromi ci na (PM), (Traut y Monro, 1964). Este inhibidor de biosíntesis de - proteínas tanto de procarióticos como de eucarióticos es un análogo del extremo 3' de aa-tRNA. (Yarmolinsky y de La Haba 1959). Existe to tal evidencia de que PM realiza una función similar a aa-tRNA como - sustrato aceptor de péptido, pues además de su analogía con L-amino-

acil-adenosina, el derivado D de PM es inactivo, y el que no produce inhibición de reacción de carga de varios aminoácidos con tRNA. - (Yarmolinsky y de La Haba, 1959). Así PM produce la liberación del - ribosoma de las cadenas peptídicas nacientes tanto in vivo (Morris, Arlighans, Flavelukes y Schweet, 1963) como in vitro (Nirenberg, Mattahaei y Jones 1962), produciéndose la liberación por el enlace que los une al tRNA como se observó marcando radioactivamente ambos (Gilbert J. Mol. Biol. 1963), estos péptidos corresponden al extremo  $\text{NH}_2$  de las proteínas de fago usando extracto de E. Coli (Nathans, 1965). Esta separación entre el péptido y el tRNA que lo portaba no es hidrolítica sino que PM queda unida al extremo carboxilo del péptido, así se observó que PM radioactiva en un sistema de reticulocitos permanecía unida a péptidos de globina. (Allen y Zamecnick, 1962) así - como en células intactas de E. Coli de cuyos péptidos se separa sin haberse alterado por digestión de aquellos con tripsina y quimotripsina. (Nathans 1964). Puede pues, concluirse que PM se une a la cadena peptídica en su extremo carboxilo por un enlace amídico.

El primer sistema simplificado de reacción con PM de peptidil-tRNA sobre ribosomas ó subunidades 50S fue el de Traut y Monro (1964) en el cual no se requieren los factores de la fracción soluble. Se - han desarrollado varias modificaciones del mismo sistema posteriormente y así Rychlik (1966) hace reaccionar polilisil-tRNA fijado a ribo

somas lavados a alta concentración de sales con PM con los mismos requerimientos. Se ha observado que el peptidil-tRNA puede sustituirse por aminoacil-tRNA, siempre que éste tenga su grupo  $\text{NH}_2$  en sustituido, así Fmet-tRNA, con AUG como mensajero, es capaz de reaccionar con PM con los mismos requerimientos (Bretscher y Marcker 1966) e igualmente N-Ac-aminoacil-tRNA con el correspondiente mRNA (Gottesman). El Fmet-tRNA es sabido es iniciador natural de proteínas, y N-Acetil-aminoacil-tRNA puede funcionar como iniciador, con requerimiento de factores de iniciación como aquel sistema de síntesis de proteínas in vitro a concentraciones de  $\text{Mg}^{++}$  fisiológicas, (Haenni y Chapeville, 1966; Lucas-Lenard y Lipmann, 1967).

La cinética de reacción con PM de N-Ac-aminoacil-tRNA es más lenta que la de peptidil-tRNA con mas de dos aminoácidos, sin embargo es más rápida que la de diaminoacil-tRNA mientras que aminoacil-tRNA no reacciona apenas (Panet, Groot y Lapidot, 1970). Todo ello parece indicar la significación que puede tener el que haya un grupo  $\text{NH}_2$  capaz de protonarse, en la proximidad del tRNA para que pueda donar el aminoácido o péptido.

Hay evidencia de que esta reacción de PM es catalizada por un enzima y de que éste es el mismo que lo hace en la formación de enlace peptídico durante la síntesis de proteínas. En cuanto al primer



punto la gran especificidad hacia los sustratos, así el análogo de PM con D-fenilalanina en vez de L-fenilalanina como en PM no es activo, el requerimiento absoluto de ribosomas, que pierden su efecto activador al disgregarlos ó desnaturalizar sus proteínas, su estrecha dependencia de iones y pH, su sensibilidad a inhibidores y definitivamente su comportamiento cinético, no dejan lugar a dudas. Estos criterios pueden servir para mostrar que este enzima es el catalizador de enlace peptídico.

Hay gran similaridad entre los sustratos de ambos y en su especificidad: sólo es activa PM que lleva un resto similar a L-fenilalanina y ha de ir unido a la posición 3' del nucleósido como en aa-tRNA . Existe la misma dependencia total hacia ribosomas, así mismo con respecto a los requerimientos iónicos y pH. (Maden y Monro 1968). Presentan la misma susceptibilidad a una serie de inhibidores (Monro y Vázquez, 1967). Una prueba concluyente es también que peptidil-tRNA fijado a ribosomas lavados y en presencia de poli A es capaz de reaccionar con PM o con un lisil-tRNA en las mismas condiciones y sin requerimiento de GTP ni factores de fracción soluble (Gottesman, 1967).

Es universalmente admitido que todo peptidil-tRNA, aa-tRNA o análogos, que es capaz de reaccionar con PM esta situado en el sitio donador de peptidiltransferasa del ribosoma (sitio P).

Aquí describiremos un método de fijación para PM, la cual es di

ficil de apreciar dada la baja afinidad de este antibiótico para el ribosoma.

Así pues la subunidad 50S es capaz de catalizar la formación de enlace peptídico en ausencia de GTP y factores de la fracción soluble las pruebas antes descritas indican que el enzima es parte constituyente de aquella subunidad y no es una proteína adherida de la fracción soluble y en efecto por lavados sucesivos en alta concentración de cationes monovalentes no se va perdiendo esa actividad, así como tampoco lo hace por la adición de grupos bloqueadores de sulfidrilo que inactivan los factores de la fracción soluble. (Traut y Monro 1964)

La subunidad 50S sin necesidad de 30S ni de mRNA es capaz de catalizar formación de enlace peptídico, pero para ello necesita la presencia de un alcohol. así decrece el efecto activador en el orden - metanol > etanol > isopropanol > cetona mientras son inactivos una serie de disolventes como n-Propanol. etilenglicol etc. (Monro, Stachelin, Celma y Vázquez 1969).

En estas condiciones 50S puede formar enlace peptídico, sintetizando a partir de aa-tRNA di, tri y tetrapeptidil-tRNA y entre FMetionil-tRNA y aa-tRNA (Monro 1969). Así mismo en iguales condiciones reacciona N-formil-metionil-tRNA con PM (Monro, Cerná y Marcker 1968)

Es sabido que el tRNA de aa-tRNA y peptidil-tRNA además de la región del anticodon interacciona con el ribosoma por varias de sus par

tes, y que una de ellas ha de ser la del otro extremo 3' terminal con el centro enzimático peptidiltransferasa. (Dube, Rudland, Clark y - Marcker 1969; Nubuoyski, Shimizu, Hayashi y Miura 1970). Se ha estudiado la capacidad de sustratos para peptidiltransferasa de fragmentos terminales de peptidil-tRNA o análogos y de aa-tRNA. Así se ha - mostrado, que para aa-tRNA, C A-Gly tiene capacidad de sustrato aceptor similar a PM reaccionando con peptidil-tRNA (Rychlik, Chladek y Zamlicka 1967) (Symons y col. 1969).

En cuanto a sustratos donadores se ha observado que tanto N-formil-metionina, como N-Ac-Leucina necesitan ir unidos al menos a CCA por su adenosina, y que CA-Leu-Ac ó CA-Met-F, no son ya activos como donadores, mientras que CCA-Leu-Ac, es tan activo como CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu-Ac aunque todos son menos activos que Ac-Leu-tRNA (Monro Cerná y Marcker 1968). En el caso de CACCA-Leu-Ac o UACCA-Leu-Ac se fijan más fuertemente a ribosomas o subunidades 50S, en presencia de etanol que en su ausencia, mientras que para CACCA-Leu ó UACCA-Leu la estimulación producida por etanol es menor (Celma, Tesis doctoral).

El empleo de estos sustratos simplificados hace idóneos estos - sistemas para estudiar las interacciones que tienen lugar en las in- mediaciones del centro peptidiltrasferasa, evitando otras interacciones de tRNA, que pueden enmascarar estas. Así la reacción de fragmentos de aa-tRNA sustituidos en  $\alpha$  NH<sub>2</sub> del aminoácido con PM catalizada

por 70S o 50S en procariotes y 80S en eucariotes, y activada por metanol o etanol, denominado generalmente reacción del fragmento, se ha convertido en un sistema de elección para el estudio específico de formación de enlace peptídico (Monro, Černá y Marcker 1968; E. Battaner, Tesis doctoral 1971).

El mecanismo de esta reacción y en especial el efecto estimulador del alcohol no es conocido. En cuanto a éste último se sabe que no es debido a efecto de precipitación de ribosomas, ni a coprecipitación de ribosomas y sustratos, así como tampoco a una disminución de la constante dieléctrica del medio acuoso.

Se ha apuntado la posibilidad de que el alcohol actuaría como un sustrato aceptando peptidil o análogo en reacción de transesterificación y el éster reaccionaría con PM. (Silverstein 1969). Sin embargo el que se requiera alcohol cuando peptidil-tRNA o sus análogos no están estabilizados por 30S y mRNA así como que alcoholes estimulen la fijación de peptidil-oligonucleótidos al ribosoma indica que su efecto debe de ser la estabilización a la subunidad 50S del sustrato donador, mediante un cambio en la conformación ribosómica. El uso de alcohol como activante de funciones ribosómicas se va extendiendo; así para terminación (Tompkins, Scolnick y Caskey 1970).

En este trabajo iniciamos un estudio cinético de la reacción de fragmento con objeto de poder interpretar mejor los resultados de su

inhibición por antibióticos.

Hasta ahora los ensayos de inhibición de reacción de enlace peptídico se habían hecho con sistemas mas complicados por lo que no es de extrañar que se obtengan resultados contradictorios con los diferentes métodos en ciertas ocasiones. Para poder deducir el mecanismo de acción de un antibiótico a partir de medidas cinéticas, es necesario el tener un sistema en el que se eviten otras reacciones o interacciones que no sean la deseada y que ésta misma tenga una cinética homogénea. En este caso se han estudiado sistemas como incorporación de un aminoácido en cadena peptídica respecto al aa-tRNA como sustrato variable. (Coutgeogropoulos 1967). Este sistema presenta los inconvenientes de que por un lado implica varias reacciones enzimáticas formación de enlace peptídico, traslocación, fijación enzimática sin que se sepa cuales son las significativas cinéticamente y que por otro lado, en la misma formación de enlace peptídico los sustratos - presentan múltiples interacciones no habiendo prueba de que la cinética de esta reacción sea homogénea al variar la longitud de peptidil-tRNA reaccionante, siendo así difícil el poder conocer el tipo de inhibición de los antibióticos ensavados.

Sistema más simplificado es el de reacción de PM con peptidil-tRNA unido a ribosomas (Traut y Monro 1964; Rychlik 1966). Con él se evitan las otras reacciones que enmascaran la de formación de enlace

peptídico en el proceso de polimerización de los aminoácidos, así como las interacciones del aa-tRNA con el resto del ribosoma al usar -PM. Sin embargo aparte de la dificultad de realizar medidas de liberación de péptido de longitud variable con la precisión necesaria, presenta el inconveniente de la heterogeneidad en la cinética, una reacción rápida y luego una lenta. (Maden, Traut y Monro. 1968) que puede explicarse a la vista de los resultados de Panet y col. (1970), -de la distinta cinética en reacción con PM de dipéptidos y péptidos superiores que corresponderían a la lenta y rápida respectivamente. No obstante con polilisil-tRNA fijado a ribosomas se ha empleado en medidas cinéticas por Goldberg y Mitsúgi (1967).

También en reacción de PM. esta vez con N-Acetil-fenilalanil-tRNA fijado a ribosomas, es en el que Pestka (1970) realiza pruebas de -inhibición cinética para distintos antibióticos. En este caso también se ha superado la heterogeneidad del sustrato donador, sin embargo todavía existen varios pasos en la fijación de las distintas partes de Acetil-fenilalanil-tRNA al ribosoma, y como el mismo autor indica, -no se sabe cual es el inhibido por los antibióticos. Así mismo las -representaciones de Lineweaver-Burk con PM variable no siempre muestran la forma lineal pareciendo estar ante una reacción con dos enzimas para un sustrato que quizá sea debido a dos posiciones de Acetil fenilalanil-tRNA.

En el presente trabajo se inicia un estudio cinético de la reacción de fragmento que por su simplicidad nos asegura el que reducimos las interacciones de los sustratos con el ribosoma, otros que las del - centro peptidiltransferasa.

Este nos permitirá interpretar los resultados de inhibición de antibióticos, siendo conscientes de la conveniencia de ensayar distintos sustratos donadores, dada la diferente cinética de reacción según su naturaleza. (Panet, Groot y Lapidot 1970); en principio se ha ensavado con CACCA-Leu-Ac cuya velocidad de reacción con PM es intermedia entre dipeptidil y polipeptidil-tRNA.

Con objeto de poder comparar los resultados de inhibición en este sistema con los de fijación se ha desarrollado un método de gran sencillez para medir ésta en presencia de etanol,. En todos los casos se ha probado si etanol producía variación en el número de sitios - para fijación por ribosoma, y el efecto producido sobre la afinidad por el mismo.

En el caso de estudio de fijación sin etanol, se han empleado - las técnicas usuales de ultracentrifugación (Haves y Velick 1954), - diálisis en equilibrio, filtración por membranas de nitrato de celulosa (Nirenberg y Leder 1964) habiendo además modificado la técnica de ultrafiltración a presión a través de membranas Diaflo de Paulus (1969), de modo que se acorta mucho el tiempo de separación de ribo-

somas, muy util para los que presentan gran labilidad.

Con los datos así obtenidos utilizando las representaciones de Klotz o recíproca y de Scatchard (1949) hemos caracterizado los tipos de fijación que existen entre un antibiótico y el ribosoma, y si estas fijaciones son o no dependientes entre sí, así como el número de moléculas del mismo que presentan cada fijación. Las afinidades es posible así el medirlas como constantes de disociación ( o asociación) las cuales son de utilidad para relacionarlas con las constantes de inhibición de la reacción de fragmento, permitiendo así el saber si un tipo de fijación es responsable, y en que medida de la inhibición de formación de enlace peptídico. Así mismo nos sirven para calcular la energía libre de fijación de los antibióticos que junto con la en talpía y entropía de fijación calculadas también de aquellas a distintas temperaturas, nos permitirán conocer la naturaleza de los enlaces de las fijaciones.

Los valores de estas constantes así mismo son un índice idóneo para comparar capacidad inhibidora de enlace peptídico de un antibio tico para distintas especies, mutantes, etc.

Otro aspecto importante del plan de este trabajo es el de las - interacciones entre distintos antibióticos lo cual nos permite el ir situando sus sitios de fijación. Con interacciones entre antibióticos que se excluyen en su fijación por los mismos sitios en el ribosoma



hemos aplicado el método de Klotz, Triwush y Walker (1948) para deter  
minación de constantes de asociación a partir de constantes aparentes  
usado para albúmina. Con él es posible el calcular la constante de -  
disociación de un ligando no detectable por la inhibición que produ-  
ce en la fijación de otro que si lo es, confirmando la constancia de  
este valor para distintas concentraciones del no detectable que ambos  
se excluyen en sus sitios de fijación.

En fin, como se ha dicho este trabajo es parte de un amplio plan  
de estudio de interacción de inhibidores con los ribosomas en el que  
se requiere coordinar datos de interacción directa de ambos con los  
de efecto en formación de enlace peptídico probando así la funcionali-  
dad de aquella. Para éste se han elegido ribosomas de E. Coli MRE 600  
sin ribonucleasa I, tanto por su estabilidad como por el conocimiento  
que tiene de sus propiedades físicas, de la identificación de sus -  
distintas proteínas, así como del conocimiento genético de aquellos  
(Nomura 1970).

Esquematzaremos a continuación el estado actual del conocimien-  
to sobre el modo de acción de los antibióticos principalmente estudia-  
dos en este trabajo.

Si bien es sabido que cloranfenicol (CM) ejerce su acción antibió-  
tica por inhibir primordialmente biosíntesis de proteínas (Gale y Fol-  
kes, 1953) no lo es tanto el mecanismo por el que ejerce ésta. Dentro

de este proceso se ha demostrado que CM no afecta la activación de los aminoácidos (De Moss y Novelli, 1955) ni síntesis de aminoacil-tRNA (Lacks y Gros, 1959) pero bloquea la polimerización de los aminoácidos a partir de aquel en sistemas de extractos celulares (Niremberg y Matthaei 1961, Nathans y Lipmann, 1961), observándose que varía el grado de inhibición según sea la composición del mRNA empleado, no habiendo sin embargo efecto de CM en fijación de poli C o poli U a ribosomas (Kucan y Lipmann 1964). El mismo resultado negativo en fijación de poli A a ribosomas por CM encontraron Speyer J.F. y col (1963).

Simultáneamente se detectó la fijación específica de CM a ribosomas de microorganismos procarióticos que no se produce en ribosomas citoplásmicos de eucariotes (Vázquez, 1964). Esta unión se produce a la subunidad 50S del ribosoma (Vázquez, 1964). La fijación que era aproximadamente de una molécula por ribosoma no era afectada por Poli U, poli A o poli C. (Wolfe y Hahn, 1965).

Se ha visto con distintos sistemas de formación de enlace peptídico que CM inhibe esta reacción así lo hace en reacción entre polifenilalanil-tRNA fijado a ribosomas y PM (Traut y Monro, 1964) peptidil-tRNA y PM (Cundliffe y Mc Quillen 1967); entre Ac-Fenilalanil-tRNA y PM (Cerna, Rychlik y Pulkrabek 1969; Gottesman 1967). inhibe reacción de polilisil-tRNA fijado a ribosomas con PM (Cerna y col. 1967),

mientras que la inhibición es mucho menor en reacción de aquel con una molécula de lisil-tRNA (Gottesman 1967). La variación del grado de inhibición según la naturaleza de los sustratos se vuelve a poner de manifiesto al hacer reaccionar distintos peptidil-tRNA con PM (Tanaka, Teraoka y Tamaki, 1971). En cuanto al mecanismo de esta inhibición se sabe que no tiene efecto o es escaso en la fijación de aa-tRNA al ribosoma, tanto en condiciones de alta concentración de  $Mg^{++}$  (Vázquez y Monro 1967) como en fijación activada por factores a concentración fisiológica de  $Mg^{++}$  (Yukioka y Morisawa, 1969). Por otro lado se sabía que CM compite con PM (Goldberg y Mitsugi 1967); (Petka 1970) en reacción de PM. Inhibe totalmente fijación de extremo 3' de aa-tRNA, UACCA-Leu (Celma, Tesis doctoral). Estos resultados no se contradicen si se tiene en cuenta la multiplicidad de interacciones que presenta aa-tRNA con el ribosoma que en presencia de CM quedaría afectado solamente en la colocación correcta de su extremo 3'.

Basándose en la estructura química de CM se ha postulado que competiría con péptidil-tRNA (Hahn, 1968) sin embargo CM no tiene efecto en fijación de polilisil-tRNA a ribosomas (Cerna, Rychlik y Pulkrabek 1969), mientras que produce estimulación de extremo 3' de N-Acetil-Leu tRNA, CACCA-Leu-Ac (Celma. Tesis doctoral) así como de N-Acetil-fenilalanil-tRNA (Herner, Goldberg y Cohen, 1969).

Así pues hay evidencia de que CM interacciona con formación de

enlace peptídico desde las proximidades del centro enzimático.

Sin embargo hay autores que basándose en que CM inhibe la forma ción de enlace peptídico estimulada por factores de traslocación y - GTP, sitúan su acción en un paso previo a la formación del enlace - peptídico relacionado con la posición correcta de peptidil-tRNA. - (Weber y Demoss, 1969). Por otra parte también se ha apoyado esta hi pótesis por resultados de Julian (1965) en los que se mostraba que - efecto de CM en polimerización de lisina dirigida por poli A no se - inhibía la formación de dipéptidos, sin embargo no puede excluirse - que se trate que esta formación es el resultado de una menor sensibi li lidad de este primer enlace entre estos dos aa-tRNA a CM o sencilla- mente de una distribución estadística de inhibición o ambas cosas. - Así mismo para Julian sin embargo en polimerización de prolina CM in hibe todos los péptidos. (Irvin y Julian 1970).

Nosotros en este trabajo hemos estudiado cuantitativamente su fi jación a ribosomas de E. Coli, B. Subtilis y A. Montana, así como su inhibición en reacción de fragmento.

Lincomicina es un antibiótico con actividad contra bacterias Gram positivas y algas azules y en menor extensión en bacterias Gram neg ativas (Hanke, Mason, Burch y Teick 1963). No tiene actividad en cito plasma de eucarióticos aunque sí en cloroplastos. Aunque tiene acti- vidad inhibidora en algunas mitocondrias parece ser que no tiene -

efecto en las de mamíferos, lo que le haría menos tóxico que cloramfenicol. Algunos de sus análogos como clindamicina poseen acción contra plasmodios. (Lewis, 1968).

Pronto se observó en células intactas que produce primeramente inhibición de síntesis de proteínas aunque más tarde se afectaron los ácidos nucleicos probablemente por efecto de aquella (Josten y Allen 1964). Esto se confirmó al estudiar su efecto en extractos celulares de diversos microorganismos. (Vázquez 1966; Chang y Weisblum 1966; - Rodríguez-López y Vázquez 1970).

Su acción se sitúa sobre el ribosoma y específicamente en la subunidad 50S. Primeramente se observó que inhibía fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM (Vázquez 1966 b) y más tarde con el antibiótico marcado se observó - fijación a ribosomas de bacterias Gram positivas (Chang y Weisblum - 1967) y de algas azules (Rodríguez-López, Celma, Fernández-Muñoz y - Vázquez 1968). Paralelamente mediante pruebas de sensibilidad a LM - con ribosomas híbridos conteniendo subunidades de B. stearotermófilus y E. Coli se identificó 50S como subunidad interaccionante (Chang, - Sih y Weisblum 1966). En ribosomas de E. Coli no se detectó fijación (Chang y Weisblum, 1967). Es de interés el antagonismo observado in vivo entre lincomicina y eritromicina en St. Aureus (Barber y Watercoorth 1964).

Existe evidencia de que LM inhibe formación de enlace peptídico

así inhibe reacción de PM con formil-metionil-tRNA (Monro y Vázquez 1967) y N-Acetil-Leucil-tRNA o sus fragmentos terminales en 3' (Celma, Tesis doctoral, 1971). Así mismo se ha observado que LM inhibiendo la reacción de fenilalanil-tRNA con PM no lo hace del paso del - mismo del sitio acceptor al donador, ni interfiere con la salida de - tRNA deacilado, procesos que tienen lugar en traslocación (Igarashi, Ishizuka y Kaji 1969).

Una evidencia de interacción de LM con el centro peptidiltrans-ferasa es la inhibición de los fragmentos UACCA-Leu totalmente y - CACCA-Leu-Ac parcialmente (Celma, Tesis doctoral 1971).

En este trabajo se ha caracterizado cuantitativamente la fija-ción de LM a ribosomas de E. Coli, B. Subtilis y A. Montana. A su vez se ha estudiado su fijación en presencia de PM, eritromicina y una - serie de antibióticos que interaccionan con la subunidad 50S.

También se ha hecho una aproximación al conocimiento de la razón de la distinta actividad antibiótica de una serie de análogos estruc-turales de LM entre los que estan celesticetina y clindamicina de ma-yor actividad que LM y con acción plasmodicida.

Al grupo de antibióticos que contienen en su molécula una estruc-tura de nucleósido pertenecen gougerotina, esparsomicina, amicetina, todos ellos de amplio espectro y con toxicidad además de puromicina. Sin embargo, pese a esta semejanza estructural con puromicina no po-

seen la capacidad de ésta de reaccionar con cadenas peptídicas naciesen tes. (Coutsogeorgopoulos, 1967; Clark y Chang 1965).

Al grupo de antibióticos que contienen un nucleósido en su molécula pertenecen entre otros, además de puromicina, esparsomicina, -gougerotina y amicetina. (revisión en Suhaddnik 1970). Son éstos producidos por distintas especies de Streptomices y presentan un amplio espectro de acción en bacterias tanto Gram positivas como negativas. Sin embargo su empleo en terapéutica viene limitado por su toxicidad ya que también tienen efecto en células de mamíferos, aunque por esto se haya usado esparsomicina muy restringidamente como agente antitumoral. Se observó que ejercen su acción inhibidora, tanto en microorganismos como en mamíferos por bloquear primordialmente la síntesis de proteínas, y con un desfase y probablemente por aquel efecto, la de DNA y RNA. Así para esparsomicina fue observado por Slecta en células de E. Coli (Slecta 1965) y en sistemas de incorporación de aminoácidos en extractos celulares Goldberg y Mitsugi (1966) de E. Coli y Colombo, Felicetti y Baglioni (1966) de reticulocitos de conejo. - Para gougerotina se observó en los mismos sistemas in vitro por Clark y Gunther (1963) y Clark y Chang (1965) respectivamente en extractos de E. Coli y reticulocitos. En el caso de amicetina fue observado por Coutsoegeorgopoulos (1967).

Por su similitud estructural con PM podría esperarse que tuvie-

ran también su capacidad de liberar las cadenas peptídicas nacientes sin embargo, no es así para ninguno de los tres. Son inhibidores de formación de enlace peptídico como indica el que bloqueen la reacción de fragmento (Monro y Vázquez 1967), la reacción de N-Acetil-Fenilalanil-tRNA con PM en la que esparsomicina y gougerotina competirían con ésta mientras no lo haría amicetina (Pestka 1970), así de la reacción de polilisil-tRNA fijado a ribosomas también con PM, con la cual esparsomicina sería competitivo con PM mientras que gougerotina lo sería de tipo mixto. (Goldberg y Mitsugi, 1967).

Simultáneamente se situó la interacción de amicetina y gougerotina, subunidad 50S por su efecto sobre fijación de CM. (Chang, Sidikol y Weisblum 1969).

En cuanto a la interacción con el centro peptidiltransferasa es importante el efecto estimulador que esparsomicina produce en la fijación del sustrato CACCA-Leu-Ac formando un complejo de gran estabilidad, incapaz de reaccionar con sustrato aceptor observado por Celma (Tesis doctoral), efecto que tiene también lugar con N-Ac-Fenilalanil tRNA (Herner y Goldberg 1969) (Jimenez, Monro y Vázquez 1970). Asimismo esta acción ocurre en ribosomas 80S de eucarióticos (Battaner, Tesis doctoral 1971). Gougerotina y amicetina también presentan este efecto estimulante tanto en CACCA-Leu-Ac (Celma, Tesis doctoral) como con Acetil-fenilalanil-tRNA (Herner, Goldberg y Cohen 1969) aunque



con menor intensidad.

En cuanto su efecto sobre fijación de UACCA-Leu esparsomicina - produce también, aunque en mucho mas pequeña proporción efecto estimulante, gougerotina que estimula fijación enzimática de aa-tRNA - (Yukioka y Morisawa 1969). Nosotros hemos estudiado la interacción de estos antibióticos con la de CM, LM y ER, así como el efecto de - esparsomicina en fijación de PM.

Son los macrólidos un grupo de antibióticos sintetizados por varios Streptomyces que presentan una estructura química común: Un anillo de tipo lactona de gran tamaño, al cual estan unidos distintos - restos de azúcares y aminoazúcares, y una acción antibiótica bacteriana con clara preferencia sobre Gram positivos.

Aunque no es bien conocido la acción que tienen en otros procesos metabólicos parece que su efecto primero es inhibición de síntesis de proteínas.

Así se ha observado en células completas (Brock y Brock 1959) y en sistemas acelulares, (Vázquez 1966), observándose como en el caso de CM dependencia del grado de inhibición con la composición del mRNA empleado.

Dentro del proceso de biosíntesis de proteínas no inhibe la formación de aa-tRNA (Mao y Wiegand 1968). Que su efecto se debe a la - interacción con ribosomas lo demuestra la fijación de diversos macró

lidos a ribosomas 70S, así de E. Coli (Tanaka, Teraoka, Nagira y Tamaki 1966), de B. Subtilis (Taubman, Jones, Young y Corcoran 1966) y de St. aureus (Mao, 1967). Espiramicina se fija a ribosomas de E. Coli (Vázquez 1967 b). Mientras que los macrólidos oleandomicina, carbomicina, neoespiramicina III y forocidina III se sabe interaccionan con el ribosoma al inhibir la fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) eritromicina o ( $^{14}\text{C}$ ) espiramicina (Wilhelm, Oleinick y Corcoran, 1967; Vázquez 1967 b).

Esta fijación se correlaciona con la inhibición producida por los antibióticos en la síntesis de proteínas (Oleinick y Corcoran, 1969).

La fijación de ER se localiza en la subunidad 50S del ribosoma, tanto por experimentos de fijación directa (Taubman y col. 1966) como por inhibición de fijación de otros antibióticos que se unen a dicha subunidad (Vázquez 1967).

No es conocido en que fase o fases del ciclo ribosómico de síntesis de proteínas ejercen su acción los distintos macrólidos. Mao en un estudio sistemático ha mostrado que no inhiben fijación de mRNA a ribosomas (Mao y Wiegand 1968), ni fijación de aa-tRNA a los mismos tanto en presencia como en ausencia de factores de la fracción soluble (Mao y Robishaw 1971).

Ensayando el sistema de reacción de fragmento espiramicina, carbomicina y angolamicina inhiben formación de enlace peptídico mientras

que eritromicina, oleandomicina, neoespiramicina y forocidina no lo hacen (Monro y Vázquez 1967). Estos resultados han sido corroborados por su efecto en formación de dilisina, en ausencia de factores de -traslocación y en reacción de FMet-tRNA con PM (Mao y Robishaw 1971). Sin embargo utilizando eritromicina, oleandomicina y neoespiramicina se muestran inhibidores de esta reacción, pero mucho menos que espiramicina o CA-Glicina (Cerna, Rychlik y Pulkrakek 1969) y eritromicina inhibe la adición de una molécula de lisina a polilisil-tRNA unido a ribosomas en presencia de poli A (Jayaraman y Goldberg 1968). Por otra parte espiramicina y tilosina inhiben reacción de N-Acetil-fenilalanil tRNA con PM, mientras no la inhiben eritromicina y oleandomicina, y los cuatro presentan distinto grado de inhibición con varios olipeptidil-tRNA con PM. (Tanaka, Teraoka y Támaki 1971).

A la vista de estos resultados tan variantes con la naturaleza de los sustratos para formación de enlace peptídico y a los hechos de que eritromicina inhiba formación de N-Acetil-trifenilalanina, pero no la de N-Acetil-difenilalanina (Corcoran y Oleicnick 1969), así como que solo lo haga para polipéptidos de lisina, pero no para oligopéptidos. (Tanaka y Teraoka 1968) de que no inhiba reacción de peptidil-tRNA natural unido al sitio donador, con PM (Cundliffe y Mc Quillen, 1967). Y también que eritromicina sólo inhiba la reacción de -fenil-alanil-tRNA con PM cuando éste necesita pasar del sitio aceptor

al donador por medio del factor G y GTP, así como que inhiba la expulsión del tRNA deacilado en este paso, en conjunto hacen que algunos autores hayan propuesto que eritromicina bloquea la etapa de traslo-cación (Igarashi, Ishitsuka y Kaji 1969).

Teniendo en cuenta la distinta velocidad de reacción de forma-ción de enlace peptídico (Panet, Groot y Lapidot 1970) así como la - distinta susceptibilidad de la misma a diversos antibióticos, según la naturaleza de los sustratos, es posible el suponer como hacen Mao y Robishaw (1971) que sea la formación de enlace peptídico el paso - afectado por los macrólidos con distinta afinidad según el antibió-tico y los sustratos.

Recientemente se ha observado estimulación por eritromicina de la reacción entre fenilalanil-tRNA con PM en condiciones iónicas con las que no tiene lugar, alcanzándose el máximo efecto activador cuan-do hay fijada una molécula de antibiótico por ribosoma (Teraoka y Ta-naka 1971). Por ello estos autores sugieren que el antibiótico produ-ciría un cambio configuracional en el ribosoma que produciría la es-timulación.

Nosotros en este trabajo empleando ( $^{14}\text{C}$ ) eritromicina y ( $^{14}\text{C}$ ) - espiamicina, hemos estudiado cuantitativamente la fijación de ambos a ribosomas de E. Coli. Así mismo hemos visto las interacciones de - eritromicina con una serie de macrólidos así como con otros antibió-

ticos que interaccionan con 50S.

Los antibióticos del grupo de las estreptograminas son semejantes a los macrólidos en poseer grandes anillos lactónicos, aunque difieren en tener átomos de nitrógeno. Estas, cuya estructura química no es conocida totalmente en algunos casos se agrupan como estreptograminas A y B, teniendo las del segundo grupo uniones peptídicas en su anillo. Se producen por especies de *Streptomyces* y su acción es preferente en bacterias Gram positivas, habiendo un sinergismo in vivo entre los miembros de ambos grupos. (Vázquez 1966),. Aunque no tienen los mismos efectos globales en el metabolismo celular, ambos grupos inhiben síntesis de proteínas. (Vázquez, 1966). Sin embargo no tienen el mismo efecto en este proceso: Estreptogramina A se fija a la subunidad 50S del ribosoma, mientras estreptogramina B lo hace con 50S y 30S. (Vázquez 1966 b; Ennis 1966 y 1971, Chang Siddhikoly Weisblum 1969). Ambas fijaciones de estreptograminas A y B interaccionan (Ennis 1971). Estreptogramina A inhibe formación de enlace peptídico mientras estreptogramina B o su análogo más activo viridogriseína no tienen efecto (Monro y Vázquez, 1967).

Es muy útil para situar su acción, el conocer su efecto en fijación de sustratos simplificados de peptidiltransferasa: Mientras estreptogramina A inhibe fijación de UACCA-Leu y de CACCA-Leu-Ac viridogriseína estimula significativamente ambos sustratos (Celma, Tesis

1971). En este trabajo se ha ensavado su interacción con fijación de cloramfenicol, lincomicina y eritromicina con objeto de concretar como en otros casos, sus sitios de interacción.

Es siomicina y su análogo tioestrepton, un antibiótico de tipo de polipéptidos de alto peso molecular que bloquea síntesis de proteíínas (Tanaka, Watanabe y Tamaki 1970) que inhibe fijación del factor G de traslocación al ribosoma (Mololell, Monro y Vázquez 1971). Con objeto de situar peptidiltransferasa y dicho sitio de interacción de G se ensavó el efecto de siomicina y tioestrepton en fijación de cloramfenicol, lincomicina y eritromicina.

En conjunto el conocimiento de las interacciones de estos antibióticos entre sí y con los sustratos y factores de las distintas - funciones ribosómicas, permite ir situando tanto las posiciones de - éstas como el sitio de acción de aquellos en el ribosoma.

## METODOS Y MATERIALES

## METODOS ANALITICOS

Todas las pruebas analíticas, si no se especifican otras condiciones presentan en común estas características.

- 1.- Estan hechas en una solución acuosa o de etanol y agua con Tris 33 mM ajustado el pH a 7,5 con ClH; ClK 270 mM y  $(Ac)_2Mg$  13 mM que denominamos solución standard.
- 2.- Los ribosomas empleados, si no se especifica lo contrario, han sido tratados con PM según se indicará.
- 3.- Cuando se hagan experiencias de competición de fijación entre dos antibióticos, o de inhibición de reacción de fragmento, ambos antibióticos o el inhibidor y los sustratos se pondrán simultáneamente en contacto con los ribosomas. Si no es así se especifica el orden de adición.
- 4.- La radioactividad en muestras acuosas e hidroacuosas se midió poniendo de 30 a 50 veces su volumen de líquido de Bray modificado.-  
(Naftaleno 60 g. Metanol 100 ml, Etilenglicol 20 ml, CAB-O-SIL 40 g. butil-PBD 5 g. ( o BBOT 4 g. ) y dioxano hasta 1 litro) o en el líquido de centelleo (Tolueno 66 % (v/v), Triton X 100 33 % (v/v), - BBOT 0.4 % (p/v) en espectrometro de centelleo líquido Packard con eficiencias de 65 - 75 % para ( $^{14}C$ ) y de 20 - 30 % para ( $^3H$ ).

La radioactividad en papel o filtros se midió sumergiéndolos en



tolueno con 5 % de butil-PBD en el mismo aparato, o bien para estos últimos cuando se indica en planchetas de aluminio en contador de - gas Nuclear Chicago.

Las autoradiografías se hicieron con película Kodak "Blue Brand" para rayos X.

## METODOS DE FIJACION

Diálisis en equilibrio.

Fundamento.- Este método se basa en el sencillo hecho de que el ribosoma, o cualquier macromolécula, es incapaz de atravesar los poros de unas membranas de celofan, mientras que la molécula cuya fijación quiere medirse pueda hacerlo libremente por sus dimensiones que son el criterio de selectividad. Así, si en uno de dos compartimentos separados por la membrana se encuentra la macromolécula capaz de fijar a la molécula ligando, esta por difusión se distribuirá hasta que su concentración sea igual en ambos compartimentos. Ahora bien, teniendo en cuenta que la macromolécula sustrae de la solución del compartimento donde se encuentra una cantidad de ligando de acuerdo con su afinidad por éste una vez alcanzado el equilibrio habrá en ese compartimento una concentración de ligando libre igual a la del otro compartimento más la del fijado. Así por diferencia entre las concentraciones de ligando en ambos compartimentos puede calcularse la concentración de ligando fijado mientras la del que no tiene macromolécula es la de ligando libre en el equilibrio.

Este método presenta la ventaja de que no se modifica la concentración de ribosomas como en los métodos de separación, por lo que sería de elección si no tuviera el inconveniente de la larga duración

que puede exigir dependiendo del tamaño del ligando con el consiguiente riesgo de degradación de los ribosomas si son lábiles en esas condiciones de fijación. Este tiempo puede reducirse eligiendo una membrana de poco espesor, practicando agitación con la precaución de que no sea excesiva y se produzca espuma que puede desnaturalizar algunas proteínas y por último sumergiendo las membranas en una solución de  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  a concentración y por tiempo determinado que producirán un aumento variable en el tamaño del poro de la membrana (Pierce y Free - 1961; Craig y King 1962). Nosotros lo probamos en el caso de fijación de ER y aumentaba significativamente su velocidad de paso por la membrana.

Una deformación de los resultados cuando se trata de ligandos - portadores de cargas positivas libres en nuestras condiciones de fijación podría ser para bajas concentraciones iónicas, es el efecto - Gibbs-Donnan (Tanford 1961). Por esta parte del ligando pasaría a - neutralizar la carga negativa que le dan al ribosoma los grupos fosfatos de su RNA. Este efecto aproximadamente podría medirse separando la macromolécula, una vez alcanzado el equilibrio, de la solución en que está, por centrifugación o filtración y medir la concentración - de ligando libre que en su ausencia ha de ser igual a la del otro - compartimento. Sin embargo en las concentraciones iónicas usuales, - como las aquí empleadas, este efecto puede descartarse a priori dado

que las cargas negativas de los ribosomas son compensadas por los iones  $Mg^{++}$  y  $K^{+}$  que estan en altas concentraciones con respecto a aquellos.

Técnica experimental.- En primer lugar para probar si el método puede aplicarse para un antibiótico ha de ensayarse: Que el antibiótico atraviesa la membrana, cuanto tiempo tarda en hacerlo en distintas condiciones y como varía la capacidad de fijación de los ribosomas durante este tiempo. Para el primer punto dejaremos a ambos lados de la membrana una solución de iguales condiciones a las de fijación que tenga antibiótico marcado en uno de los dos lados solamente. Sometido a agitación iremos tomando alícuotas de ambas partes a intervalos de tiempo hasta que la concentración del antibiótico sea constante en ambas. Si la concentración es igual, consideraremos el tiempo que ha tardado en igualarse. Puede ser, si se usa un ligando polidiserso, como por ejemplo polidextran sulfato, que haya una fracción dializable mientras otra no lo sea, la proporción de ambas puede servirnos para introducir la corrección oportuna si interesa esta fijación. La variación de la capacidad fijadora de los ribosomas nos sirve a la vez como criterio de alcanzamiento del equilibrio y es aconsejable el hacerlo en cada ensayo aunque sean las mismas condiciones de temperatura y agitación. Simplemente consiste en ir midiendo la diferencia de concentración del antibiótico en ambos comparti-

mentos a intervalos de tiempo.

Existen muchos dispositivos para llevar a cabo pruebas cuantitativas de diálisis que se ajustan a la mayor o menor disponibilidad de macromolécula o ligando y a la distinta velocidad requerida para la fijación (Craig y King 1954; Englund, Huberman, Jovin y Kornberg 1969 y Nye, 1969).

Nosotros hemos empleado unas pequeñas cámaras hechas en lucita que permiten poner volúmenes desde 0.1 ml a 3.0 ml de solución con el antibiótico en cada compartimento, uno de los cuales lleva los ribosomas, tapados para minimizar la evaporación que puede influir para volúmenes pequeños. Antes de poner la membrana se ponía un poco de grasa de silicona en los bordes. Son de utilidad para pequeños volúmenes y es cómoda la toma de alícuotas. También hemos usado pequeñas bolsas de tubo de diálisis estrecho anudadas en ambos extremos, o bien sólo en el inferior y más largas, cuando se toman alícuotas, que después de poner de 0.1 ml a 0.5 ml de solución de ribosomas en tampón, se introducían en tubos de ensayo conteniendo de 2 a 5 ml de solución tampón con el antibiótico radioactivo.

La membrana tubo Visking (8/32), con objeto de destruir RNAsas, se hierve en solución de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  al 10 % por 15 minutos. Se lavan después repetidas veces con agua desionizada y se conserva en solución 0.1 mM de EDTA. (England, Huberman, Jovin y Kornberg, 1969) a 0-5°C.

En caso de interesar el aumento del poro se tiene un tiempo variable en solución de  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  con precaución de que no se toquen unas membranas con otras. Se lava repetidamente despues en  $\text{ClH}$  0.01 M. - (Pierce y Free 1961).

Las membranas antes de su uso se lavan repetidas veces con agua desionizada y se tienen un tiempo en solución de fijación para saturarlas de iones en caso de que se vayan a manejar pequeños volúmenes. Por último se secan cuidadosamente, teniendo la precaución de evitar el contacto de las manos.

Para la medida de radioactividad es necesario tener en cuenta - el "quenching" que puede tener la solución de ribosomas. Así mismo - es aconsejable el tomar una alícuota de cada cámara o bolsa de solución de ribosomas para leer densidad óptica al final de la experiencia.

#### Método de ultracentrifugación.

Fundamento.- Se basa simplemente en, una vez alcanzado el equilibrio, separar la macromolécula aprovechando su mayor coeficiente - de sedimentación por ultracentrifugación. La separación puede ser parcial como en el caso de fijación a caseína de iones  $\text{Ca}^{++}$  en la que - se median a varios niveles del tubo concentraciones de ambos y se tomaba como  $\text{Ca}^{++}$  el valor extrapolado para ausencia de caseína (Chanu-

tin, Ludewig y Masket 1942) o bien total hasta práctica ausencia de macromolécula tal como el estudio de Hayes y Velick (1954) para alcohol deshidrogenasa y coenzima DPN. Es necesario hacer controles - de sedimentación del ligando cuando tienen alto peso molecular, sin añadir la macromolécula. Del análisis del ligando en el tubo control sin macromolécula, y de la del mismo cuando se ha centrifugado con ella una vez establecido el equilibrio se obtiene la concentración - de ligando fijado, por diferencia, y la de ligando libre en el equilibrio.

Una modificación de este método útil cuando se trata de fijaciones de baja afinidad consiste en medir la cantidad de ligando que hay en el sedimento de macromolécula, haciendo la corrección del mismo - que hay en el líquido interpuesto. Aquí la concentración de ligando en el líquido centrifugado nos da la del mismo libre en el equilibrio mientras que la cantidad en el sedimento, en el que también se mide cuanta macromolécula ha precipitado nos da directamente la concentración de ligando fijado.

Existe una posible perturbación de las condiciones de equilibrio durante la centrifugación debido a la variación de concentración que experimentan las macromoléculas y el que el equilibrio se alcanza en tiempos muy cortos. Así se han puesto en duda que las concentraciones de ligando libre y fijado medidas como lo hacen Hayes y Velick (1954)

corresponden a las del equilibrio inicial, siendo la primera menor - de la que correspondería a éste. (Schachman, 1961). Sin embargo las representaciones por nosotros obtenidas, como en el caso de la deshidrogenasa por Hayes y Velick (1954), la forma de la gráfica es similar a las obtenidas por otros métodos y el valor de los parámetros - obtenidos difiere de éste, no creemos que éste fuera del intervalo - de error manejado. Sin embargo, teniendo esto en cuenta es conveniente el comprobar por otros métodos, preferiblemente diálisis, los resultados de ultracentrifugación para estudios cuantitativos, para poder luego usar usualmente éste, dada su gran comodidad.

Técnica experimental.- Como ensayos previos antes de emplear el método con un antibiótico es conveniente previamente el conocer que en las condiciones de centrifugación empleadas, los ribosomas al centrifugar desaparecen de una parte del tubo en la que nosotros vamos a medir la concentración del antibiótico, y que consideraremos como concentración de antibiótico libre en el equilibrio. Esto podemos hacerlo, midiendo densidades ópticas a 260  $m\mu$  de alícuotas de una solución de ribosomas a la concentración que vayamos a emplear, todo esto hecho inmediatamente de acabar la centrifugación y con gran precaución de que no sufran los tubos movimientos bruscos.

Si el antibiótico es de alto peso molecular conviene hacer controles de sedimentación del mismo, procediendo como antes, pero empleando antibiótico marcado en lugar de ribosomas.



Así mismo el tiempo de establecimiento de equilibrio que en nuestro caso no se puede medir ya que para los antibióticos empleados era mucho menor que el tiempo de centrifugación.

Si los volúmenes son pequeños, 0.1 a 0.2 ml, puede influir también la evaporación durante el tiempo de centrifugación dado el vacío de la cámara de la centrifuga. Para prever esto y el que durante la centrifugación de pequeños volúmenes los tubos se colapsen hemos empleado en ocasiones vaselina líquida que se ponía sobre la solución una vez alcanzado el equilibrio.

Es incomoda la recogida de sobrenadantes en estas condiciones, siendo lo mejor el cortar la parte del tubo que contiene la vaselina. Por esto si el tiempo de centrifugación no es muy largo y usando tubos de buena calidad no es necesaria esta precaución siendo aconsejable el poner grasa de vacío en la tapa del rotor y cerrar éste herméticamente.

Los tubos empleados en estas pruebas han sido de nitrato de celulosa, se atacan por etanol a mas de 50 % (v/v), de volúmenes 0.6 ml y 2.0 ml. En los primeros se emplearon volúmenes de 0.1 ml a 0.3 ml de solución.

Distinguiremos las dos variantes utilizadas según la afinidad del antibiótico sea muy baja o no, según se desprende de las pruebas previas.

Cuando las cantidades de antibiótico fijadas representan más del 25 % de la total añadida, se utilizó el método de poner controles - exactos a los tubos con ribosomas pero sin ellos, que nos darían la concentración total de antibiótico presente. Disminuyen los errores si se preparan dos soluciones, una con ribosomas y otra sin ellos - que se añaden con la misma pipeta a todos los tubos. Las soluciones de volumen variable pueden secarse a vacío previamente en el fondo de los tubos para lo que cuando sea posible sean con un solvente volátil como etanol. En este caso la centrifugación a 150.000 g. no necesita prolongarse mas de 2 horas para que haya garantía de que en el tercio superior del tubo no haya nada de ribosomas. Se toman alícuotas de - estos inmediatamente de parar la centrífuga y de los tubos controles.

Cuando el porcentaje de radioactividad fijada, incluso al aumentar la concentración de ribosomas no supera el 20 % del total empleamos esta variante. Junto con los tubos problema centrifugamos otros iguales con la sólo diferencia de que además llevan una concentración de antibiótico no marcado en una proporción lo suficientemente alta con respecto al marcado para asegurar que alcanzada la saturación de los ribosomas, la actividad específica ha disminuído de tal modo que la fijación fuera menor de 1 a 2 % de la problema. En este caso ambas series de tubos se centrifugan a 150.000 g. 3 a 4 horas. Se toman alícuotas de la parte superior de los tubos problema y se toma cuidadosa

mente toda la solución restante de los mismos, así como la de los tu bos controles. Se enjuagaron rápidamente con la solución salina emplea da fría una o varias veces, según la radioactividad presente, el tubo y se escurren. Los tubos húmedos con los sedimentos se ponen a vacío hasta total sequedad. Se añade entonces una alícuota de agua a todos y se resuspenden los ribosomas agitando en un mezclador. Del resuspen dido se tomará una alícuota para medir radioactividad y otra para - leer densidad óptica a 260 mμ. La diferencia entre los tubos problema y los correspondientes controles con exceso de antibiótico no marca do nos darán la concentración de antibiótico fijado excluyendo el in terpuesto en la solución que embebe al sedimento que será la concen tración de los tubos controles. Conocida la concentración de ribosomas tomados de la lectura de densidad óptica y la concentración de anti biótico libre del líquido libre de ribosomas, tenemos los datos del equilibrio con las restricciones indicadas.

En el caso de que no sea posible añadir la necesaria concentra ción de antibiótico no radioactivo por escasez, solubilidad etc., pue de hacerse el añadir distintas concentraciones del mismo para una - constante del radioactivo, extrapolando a concentración infinita de antibiótico no marcado. (Wolfe y Hahn, 1965).

#### Método de fijación por filtración.

Fundamento.- Consiste este método en separar los ribosomas por filtración de la solución a través de membranas de nitrato de celulosa (Millipore) a bajo vacío, con lo cual aquellos quedan adsorbidos a las membranas. Después de lavar el filtro con la misma solución - para quitar el ligando no fijado, puede medirse en ellos la radioactividad debida al ligando unido a los ribosomas con la correspondiente corrección para la radioactividad retenida en el filtro sin ribosomas. Básicamente el método es idéntico al ideado por Nirenberg and Leder (1964) para estudiar fijación de aminoacil-tRNA a ribosomas. - Ya que la retención se hace por adsorción de los ribosomas y no por tamización al emplear este método, hay que tener en cuenta que los filtros sólo pueden retener una cierta cantidad de los mismos sobrepasada la cual, una vez saturados, los dejan pasar. Una relativa solución puede ser el empleo de dos filtros superpuestos.

En seguida se aprecia que este método si bien es útil para pruebas cualitativas no es generalmente válido para medidas cuantitativas absolutas, en primer lugar por la parcial retención de ribosomas y - en segundo porque las diluciones que suponen el paro de la fijación y los lavados del filtro alteran totalmente la mayoría de los equilibrios de fijación. (excepción de los de gran afinidad).

Es importante el ensayo de retención de ribosomas y el de mantener el flujo que provoca la succión, estabilizándolo el tiempo que -

dure el experimento, por medio de la regulación del vacío.

Técnica experimental.- En este trabajo se ha utilizado con fines cualitativos. Después de alcanzado el equilibrio de fijación se diluía la solución 0.1 a 0.2 ml con 3 ml de solución standard empleada a 0°C. Se añadía después de agitar la dilución a unas "chimeneas" de vidrio que portaban los discos de membrana y que estaban adaptados a kitsatos por los que se hacía un ligero vacío regulado de forma que la velocidad fuera de aproximadamente 1 ml por minuto. Se añadía por dos veces la misma solución, a los tubos para lavarlos y se hacía pasar por los filtros también. Una vez filtrado todo el líquido, se secaban los filtros bajo una lámpara infrarroja y se adherían a planchetas de aluminio, en las que se medía la radioactividad en un contador de gas Nuclear Chicago.

#### Método de ultrafiltración a presión por membrana Diaflo.

Fundamento.- Consiste simplemente en separar, una vez establecido el equilibrio, los ribosomas del resto de la solución. Ya existían métodos de filtración con esta finalidad, como es el descrito para discos de Millipore (Nirenberg y Leder 1964), que como vimos no retiene ya cuantitativamente los ribosomas para concentraciones de éstos no muy altas, y no nos sirve con fines cuantitativos, o como el de filtración por membranas de celofan a presión que requiere tiempos -

largos (Mao y Putterman, 1969). Los distintos tipos de membranas - Diaflo poseen un poro de tamaño gradualmente distinto, lo que permite mediante la elección apropiada de uno de ellos el separar unas moléculas de otras de distintas dimensiones. El que el tamaño del poro tenga una relativamente amplia gama de valores permite coordinar la separación de varias moléculas de tamaño distinto con la rapidez en la filtración. El que la selección sea por tamización evita la saturación de la membrana, caso de las membranas de Millipore y de todas las que como ella retengan por adsorción, aunque para pequeñas superficies de membrana a altas concentraciones de ribosomas la filtración se hace muy lenta.

Este método para fines cuantitativos presenta el mismo inconveniente que el de separación de ribosomas por centrifugación. Variación de concentración de ribosomas durante la centrifugación. Sin embargo como veremos en este caso, es posible el ir midiendo la concentración del antibiótico en el filtrado durante el proceso y evaluar la significación de este efecto que en el caso de cloramfenicol es despreciable. Otras posibles fuentes de error son la adsorción del antibiótico a la membrana o la retención de antibiótico en el agregado de ribosomas que quede sobre la membrana.

Existen descritos diferentes dispositivos para llevar a cabo - filtración por estas membranas, adecuadas para aplicación de altas -

presiones o bien acelerarla por centrifugación. (Blatt, Robinson y - Bixler, 1968; Paulus 1969; Bowers y Haschemeyer 1968).

De ellos, el de Paulus está diseñado para medir fijaciones de - ligandos radioactivos a pequeñas concentraciones de macromoléculas por filtración a presión a través de membranas Diaflo en una cámara diseñada por el autor, que permite la fijación simultánea de varias muestras, simultaneamente. Las membranas, en las que se han depositado la macromolécula y el ligando a ella fijado, después de lavadas por su parte inferior manteniendo la presión, son introducidas en un líquido de centelleo y se cuenta su radioactividad. De esta medida descontando la radioactividad de la solución que embebe el filtro, - se obtiene la cantidad de ligando fijado, mientras que la del total es también prácticamente la libre en el equilibrio dada la baja concentración de macromolécula.

El método claramente es de gran utilidad para fijación de escasa afinidad, sin embargo, nosotros hemos modificado ligeramente la cámara de filtración de modo que es posible también el tomar filtrados. Simplemente ha consistido en poner unos pequeños recipientes que mediante una rosca cierran los tubos por donde sale el filtrado, pudiendo así recoger hasta 0.5 ml del mismo. Así la cantidad de ligando libre se mide en el filtrado y la fijada restando la del filtrado de - la total.

Técnica experimental.- Previamente hicimos pruebas de retención de ribosomas y velocidad de filtración con varios tipos de membranas. Ensayamos distintos tipos de membranas: PM 10 que retiene partículas de peso molecular mayor a 10.000; PM 30 que retiene desde pesos moleculares de 30.000, XM 50 y XM 100 que retienen respectivamente partículas mayores a 50.000 y 100.000 respectivamente.

Teniendo en cuenta las presiones que pueden soportar las distintas membranas, se ensayaron a  $1.5 \text{ Kg/cm}^2$  los tipos antes enumerados. En los cuatro la densidad óptica del filtrado era menor del 5 % de la total, sin embargo en el caso de las membranas XM 100, de mayor poro, en muchos de los casos el paso de ribosomas es total incluso a presión de  $\text{Kg/cm}^2$ , no sabemos si por fragilidad o mal estado de nuestra membrana.

Así pues elegimos XM 50 y ensayamos a distintas presiones con objeto de aumentar la velocidad de filtración que a  $1,5 \text{ Kg/cm}^2$  es de 0.2 ml por hora en nuestro aparato, sin dañar la membrana.

Se probó a 3, 4 y  $5 \text{ Kg/cm}^2$  con una concentración de ribosomas de 5 mg/ml, y en ningún caso la densidad óptica en el filtrado pasaba del 5 % de la total. Ya a  $5 \text{ Kg/cm}^2$  había gran pérdida de presión en el aparato y se optó por hacer las determinaciones siguientes a la presión de  $4 \text{ Kg/cm}^2$ , al cual la velocidad de filtración inicial era de 0.3 ml por hora.



Encontradas unas condiciones de trabajo procedimos a medir la -  
posible adsorción de ( $^{14}\text{C}$ ) CM a la membrana XM 50, ( $^{14}\text{C}$ ) CM en las -  
condiciones de fijación y sin ribosomas a  $2 \times 10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M y -  
 $10^{-6}$  M mantenía el 95 % de su concentración en los primeros 0.05 ml  
de filtrado.

A continuación se probó la retención de ( $^{14}\text{C}$ ) CM a membranas en  
presencia de ribosomas. Así a unas concentraciones de ( $^{14}\text{C}$ ) CM de -  
 $10^{-6}$  M y  $2 \times 10^{-6}$  en las condiciones usuales con una concentración -  
de ribosomas de 5 mg/ml en tubos control se añadió ( $^{12}\text{C}$ ) CM a una con-  
centración de  $10^{-3}$  M. Mientras en los tubos con ( $^{14}\text{C}$ ) CM solamente -  
había un 44 % de retención en el caso de tener también ( $^{12}\text{C}$ ) CM sólo  
un 2 % de retención en los 0.075 ml primeros de filtrado. Así juzga-  
mos que era necesario el emplear controles de atrapamiento en el ca-  
so de usar CM.

Con objeto de ver si con este método se produciría una posible  
variación del equilibrio durante la filtración hicimos un experimen  
to de fijación en el que filtrando 0.3 ml una solución de ribosomas  
a 4 mg/ml con  $2 \times 10^{-6}$  M de ( $^{14}\text{C}$ ) CM, a  $4 \text{ Kg/cm}^2$  se tomaron alícuo-  
tas de 0.02 ml del filtrado según iba pasando la membrana a los 10,  
15, 30 y 40 minutos no observándose variación en su radioactividad.  
Paralelamente se tomaron alícuotas del líquido sobre el filtro en -  
las que se midió la densidad óptica y así mismo no se observó variacia

ción en la misma a lo largo del tiempo de filtración, a pesar de la reducción de su volumen. Así pues parece ser que los ribosomas se - van quedando adheridos a la membrana según va filtrando la solución de modo que el aumento de concentración que experimentan, no altera el equilibrio de fijación. La representación de la isoterma de fija ción para CM obtenida por éste método corrobora el resultado anterior

Se ha usado una presión obtenida con nitrógeno de 3 a 4 Kg/cm<sup>2</sup>. Los volúmenes de filtración variaron entre 0.1 a 0.3 ml que se ponen sobre los filtros una vez acabada la incubación, pudiéndose recoger el 50 % del volumen puesto.

Como precauciones casi obvias podría decirse el añadir un poco de grasa de silicona en los tubos diseñados para lavado del filtro Paulus (1969) para evitar que salga el filtrado por los mismos. Cuando los volúmenes son de 0.1 ml el filtrado queda adherido a la parte inferior de la membrana. En el caso de medir radioactividad en membra nas, hacer controles que "quenching" y tener precaución de que toda la solución quede sobre el filtro y no por las paredes.

#### Método de sedimentación para soluciones con etanol.

Fundamento.- El objeto de este método es el poder relacionar las medidas de fijación con las de reacción de fragmento con etanol. El que los ribosomas a la concentración de etanol de 33 % (v/v), que es

la que se emplea en esa reacción, sedimenten fácilmente por centrifugación a bajo número de gravedades nos permite el obtener comodamente su separación de la solución de fijación. Varios son los inconvenientes que a primera vista presenta esta técnica: así en primer lugar - parecería que debido a la agregación de los ribosomas, a pesar de - que los ribosomas sedimentados con etanol conservan toda su actividad para las pruebas ensayadas, se produciría una distorsión de los mismos que haría de la fijación un artefacto. Por otro lado podría - tener el inconveniente de atrapar el antibiótico entre los ribosomas de modo que impidiera la reversibilidad de su fijación si la hubiera y por último presentaría la posible variación del equilibrio durante la sedimentación que lo imposibilitaría para estudios cuantitativos absolutos. Sin embargo en las condiciones empleadas al hacer los correspondientes controles de estos posibles inconvenientes encontramos que las fijaciones de antibióticos estudiados llevados a cabo en presencia de 33 % de etanol, comparados con la que se hicieron en su - ausencia no presentan modificación sustancial en el número de sitios de fijación aunque como sería de esperar las afinidades se modifican. Este resultado junto con que estas fijaciones se correlacionan sustancialmente en cuanto a interacciones de unos antibióticos con otros cosa que no ocurriría si las fijaciones no ocurrieran en el mismo sitio del ribosoma con o sin etanol, nos permiten dar generalidad, alas

relaciones con este método obtenidas. Es mas, cuando la afinidad siendo pequeña aumenta considerablemente, caso de LM para ribosomas de E. Coli, nos permite el estudiar con facilidad fijaciones dificilmente cuantificables. En cuanto a la reversibilidad hemos visto, se conserva para CM y LM y ER, dado que etanol aumenta mucho su afinidad, su comportamiento parece irreversible por la lentitud de su reversión Y por último en lo que respecta a la posible distorsión del equilibrio por la variación de concentración que experimentan los ribosomas durante la sedimentación para los antibióticos aquí estudiados, la forma de las representaciones para las isotermas de fijación presentan la misma forma tanto en presencia de etanol como en métodos como diálisis en equilibrio libres de esta posible distorsión. Estos resultados nos han permitido el emplear el método de etanol para estudios cuantitativos, que comparamos con las cinéticas de reacción de fragmento.

Técnica experimental.- Como en el caso de centrifugación se han empleado dos variantes dependiendo de la afinidad del antibiótico empleado: a) Medir radioactividad en solución despues de sedimentar los ribosomas y en tubos de control sin éstos, b) Medida de radioactividad despues de centrifugar en solución y en sedimento una vez lavado, para antibióticos de muy baja afinidad.

a) Cuando aplicamos este método es necesario hacer dos pruebas de -

control: De separación de ribosomas y de no variación de concentración de antibiótico en la solución debida a efecto de la separación de los ribosomas. Para el equilibrio hay que tener en cuenta la concentración de ribosomas ya que cuando es menor de 1 a 2 mg/ml o sobre pasa los 25 mg/ml la sedimentación puede no ser total. En los experimentos aquí normalmente utilizados, con concentraciones de ribosomas de 4 a 10 mg/ml una centrifugación de 15 minutos a 5000 g es suficiente para sedimentar mas del 98 % de los ribosomas. En cuanto al segundo, cuando se hace la fijación con varias concentraciones de ( $^{14}\text{C}$ ) CM o ( $^{14}\text{C}$ ) LM y en tubos control además un exceso de ( $^{12}\text{C}$ ) CM o ( $^{12}\text{C}$ ) LM respectivamente que reduce la fijación a menos del 2 % no se observa en ningún caso, para 5 mg/ml de ribosomas que en dichos tubos controles haya variación de concentración de antibiótico respecto a los tubos que no llevan ribosomas, por efecto de la sedimentación de los ribosomas.

Las condiciones usuales del ensayo han sido el desecar los antibióticos presentes en tubos cónicos de vidrio o de ultracentrifuga - de nitrato de celulosa y añadir 0.10 ó 0.15 ml de una suspensión de ribosomas en las condiciones iónicas standard con etanol al 33 % - (v/v). Paralelamente en tubos controles también con los antibióticos se añadió el mismo volumen de solución standard sin ribosomas. Se - incubaron a 0°C 30 minutos, tiempo suficiente como se controló para alcanzar el equilibrio, los antibióticos empleados, transcurridos -

cuales se centrifugaron 15 minutos a 4000 - 5000 g. en cámara fría a 4°C, tomándose 0.075 ml ó 0.100 ml de solución de estos tubos y los controles. Se mide densidad óptica a 260  $m\mu$  de la suspensión de ribosomas empleada.

b) En caso de muy baja afinidad del antibiótico por el ribosoma, después de desecar en tubos de ultracentrifuga de 0.6 ml de capacidad, el antibiótico radioactivo, y de los otros antibióticos no marcados cuando se emplean, y también en controles que llevan antibiótico radioactivo y exceso de no marcado, se incubaron volúmenes de 0.150 a 0.200 ml de una suspensión de ribosomas en solución standard con etanol como anteriormente. Estos tubos se centrifugaron 20 minutos a 150.000 g con objeto de obtener un sedimento muy compacto. Se tomaron alícuotas de la solución en el caso de los tubos problema, se toma cuidadosamente todo el exceso de solución restante de estos tubos y toda la de los controles. Se enjuagan rápidamente todos dos o tres veces con solución standard con etanol frío con objeto de no alterar en lo posible el equilibrio de fijación. Una vez escurridos los tubos se desecan a vacío hasta total evaporación del líquido. Se añade un volumen de 0.150 ml de agua y se resuspenden en mezclador los ribosomas. De estos se toma una alícuota para medir radioactividad y con líquido de centelleo de Bray y otra alícuota para medir densidad óptica a 260  $m\mu$  que nos indicará la concentración de ribosomas.

## Cálculos

### a) Consideraciones generales y datos.

Hemos aplicado a los datos de fijación obtenidos en este trabajo el tratamiento matemático normalmente empleado para la fijación de ligandos a macromoléculas.

Consideramos a los ribosomas de E. Coli MRE 600, 70S y a sus subunidades 50S como macromoléculas de peso molecular  $2.65 \times 10^6$  y  $1.55 \times 10^6$  respectivamente (Hill, Rosetti y Van Holde 1969 a, Hill, Thompson y Anderegg 1969 a ; Hill, Anderegg y Van Holde 1970), ya que las determinaciones de estos autores han sido hechas con los mismos ribosomas obtenidos en condiciones iónicas similares a las nuestras. Las medidas de densidad óptica se hicieron en cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor, en un espectrofotómetro UNICAM.

El coeficiente de extinción de los ribosomas y subunidades se tomó  $E_{260}^{1\%} = 166$  (Tissiers y col. 1959), de modo que una densidad óptica a 260 mμ de 1.0 para un camino de luz de 1 cm corresponda a 60 μg/ml de aquellos.

Estas partículas presentan, en las condiciones de pH empleadas, carga negativa debido a los grupos fosfato de su RNA, sin embargo a las concentraciones de  $Mg^{++}$  y  $K^+$  empleadas estos grupos están neutralizados por ambos cationes, primordialmente por  $Mg^{++}$  (Goldberg 1966, Choi y Carr, 1967). Así pues en los casos estudiados en los que los

antibióticos se fijan en forma iónica, ya que los ribosomas se encuentran prácticamente en estado neutro no introducimos el factor de corrección para la constante de asociación que se ha empleado en el caso de fijación de sustratos iónicos a macromoléculas cargadas. (Scatchard, Coleman y Shen, 1957).

En las expresiones de equilibrio se han empleado concentraciones en lugar de actividades, ya que la diferencia entre ambos es despreciable frente a los errores experimentales.

b) Representación de las isotermas de fijación.- De los experimentos de fijación obtenemos los valores de concentración de antibiótico libre en el equilibrio (A) que la de antibiótico fijado que junto con la concentración de ribosomas nos permite calcular el parámetro  $\bar{V}$  - que se define como el número medio de moléculas de ligando fijadas - por cada macromolécula y que se medirá  $\bar{V} = \frac{\text{moles fijados de ligando}}{\text{moles totales de macromolécula}}$

Con la concentración de ligando libre y  $\bar{V}$  pueden hacerse distintas representaciones que se basan en transformar las ecuaciones de equilibrio de las reacciones  $R A_{n-1} + A \rightleftharpoons R A_n$ ,  $K_i = \frac{(R A_n)}{(R A_{n-1})(A)}$  siendo  $K_i$  la constante de asociación intrínseca.

Pueden presentarse tres casos en la fijación de un antibiótico a un ribosoma.

I.- Que haya por ribosoma varios sitios de fijación para el mismo con idéntica afinidad e independientes unos de otros en el sentido de que



fijaciones en unos no ejercen influencia en posteriores fijaciones - en otros.

2.- Que haya por ribosoma varios sitios o grupos de sitios, con distinta afinidad y que sean también completamente independientes.

3.- Que haya varios sitios por ribosoma para un antibiótico, que sean interaccionantes, de modo que la fijación en unos de ellos afecta la afinidad, aumentándola o disminuyéndola de otros sitios.

Existen tratamientos matemáticos para estos distintos casos (revisiones Edsall y Wyman 1958, Tanford 1961, Steinhardt y Beyckok 1964)

Si se cumple 1 suponiendo que haya  $n$  sitios idénticos con constante de asociación  $K$  de la ecuación general de equilibrio se llega a

$$\bar{V} = \frac{n K \left( \frac{A}{A} \right)}{1 + K \left( \frac{A}{A} \right)} \quad (1), \text{ y en el caso de que se cumpla 2 habiendo } n_i \text{ -}$$

sitios con constante de asociación  $K_i$  se cumple  $\bar{V} = \sum \frac{n_i K_i \left( \frac{A}{A} \right)}{1 + K_i \left( \frac{A}{A} \right)} \quad (2)$

Por último en caso de existir interacciones se han propuesto varias aproximaciones, una de las cuales para sitios idénticos interaccionantes se sustituye la constante de asociación intrínseca  $K$  por  $K'$ , siendo  $K' = K e^{-f(\bar{V})}$  en donde  $f(\bar{V})$  es una función arbitraria de  $\bar{V}$  sometida a ciertas restricciones (Tanford 1961).

El análisis de unos datos de fijación con objeto de conocer las constantes de asociación, el número de sitios para cada una de ellas e interacción que puede existir entre los distintos sitios, en general comienza por suponer que existen una serie de sitios de afinidad

equivalentes e independientes entre sí, representando entonces la ecuación (I) transformada de diversas maneras. Las más usuales son la recíproca o de Klotz  $\frac{I}{\bar{V}} = \frac{I}{n K (A)} + \frac{I}{n}$  ; la de Scatchard (1949) -  $\frac{\bar{V}}{(A)} = K (n - \bar{V})$  y la logarítmica  $\text{Log } K + \text{Log } (A) = \text{Log } \frac{\bar{V}}{n - \bar{V}}$  .

La elección de forma de representación debe venir condicionada por la precisión de los datos experimentales y de la complejidad del sistema. Podría decirse que la representación logarítmica permite una representación de una serie más amplia de concentración que las otras y que la de Scatchard es estadísticamente mas fideligna que la recíproca (Wilkinson 1961, Dowds y Riggs 1965). Si la hipótesis es correcta de que existen una serie de sitios idénticos e independientes de estas representaciones podemos deducir los valores de K y de n, así en la recíproca para  $\frac{I}{(A)} = 0$  el valor de la ordenada  $\frac{I}{\bar{V}}$  será  $\frac{I}{n}$  y para  $\frac{I}{\bar{V}} = 0$ ,  $K = - \frac{I}{(A)}$  .

En la representación Scatchard la intersección con la abcisa  $\bar{v}$  da n y la intersección con la ordenada K.n., así mismo K es el valor de la pendiente cambiado de signo.

Si las representaciones de las funciones anteriores no se ajustaran a las supuestas, se apartarían de la linealidad en el caso de la recíproca o la de Scatchard y de la forma sigmoide teórica en el caso de la logarítmica indicando así otras formas de fijación.

En el caso de haber varios grupos de afinidades iguales e inde-

pendientes la representación de Scatchard es la más significativa, - por lo que con mayor precisión la hemos elegido cuando ha sido posible (Scatchard, Coleman y Shen 1957).

Cuando se trata de dos grupos de sitios con afinidades muy distintas es posible mediante extrapolación el calcular las constantes para ambos (Blake y Peacocke 1968). En cualquier caso es posible ensayar las modificaciones que se producirían sobre aquellas representaciones mas simples por efectos electrostáticos en el caso de iones, o efectos comparativos por interacción entre varias fijaciones y así ajustar nuestros datos experimentales a las funciones teóricas. Así para cooperativismo positivo o de facilitación entre varias fijaciones (Changeux y Rubin 1968) como para cooperativismo negativo o de impedimento (Levitzky y Koshland 1969) se han representado curvas teóricas.

c) Cuando dos ligandos distintos A y B compiten reversiblemente por los mismos sitios de una macromolécula de modo que no puede haber fijación simultánea de ambos se cumpla que

$$\bar{V}_A = \frac{\bar{n} K'_A (A)}{1 + K'_A (A)} \quad (3) \text{ donde}$$

$$K'_A = \frac{K_A}{1 + K_B (B)} \quad (4) \text{ es la constante aparente de fijación de A para una concentración de (B) constante. Así pues en estas condiciones}$$

para (B) constante las gráficas de Scatchard y recíprocas seguirán siendo lineales pero con un valor de  $K'_A$  en lugar de  $K_A$ . Esta ecuación, por otro lado, puede aplicarse a analizar la posible competi-

ción entre un ligando e iones de la solución así para proflavina y  $\text{Mg}^{++}$  por ribosomas (Miall y Walker 1967).

Este resultado nos permite el conocer si A y B en efecto compiten por los mismos sitios reversiblemente excluyéndose en su fijación cuando para uno de ellos, sea B, no es posible el detectar directamente su fijación. A la vez permite medir su constante de asociación.

En efecto, supongamos que B es capaz de inhibir totalmente la fijación

de A. De (4)  $K_B = \frac{I}{(B)} \left( \frac{K_A}{K'_A} - I \right)$  (5). Si representamos la isoterma

de fijación de A, en ausencia de B y a varias concentraciones de

B de modo que (B) en cada una sea prácticamente constante, obtendremos

para cada (B) un valor de  $K'_A$  y de (5) un valor para  $K_B$ . Si para los

distintos (B)  $K_B$  permanece constante es indicación de que la hipótesis

de competición es correcta. Este método fue aplicado por Klotz,

Triwush y Walher (1948) para fijación de varias moléculas a albúmina

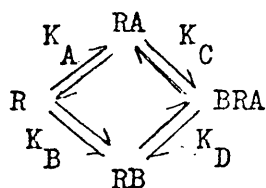
por competición con naranja de metilo. Si se cumplen estas relaciones

es inmediato que  $\frac{\bar{V}_A}{\bar{V}_B} = \frac{K_A (A)}{K_B (B)}$ .

d) En caso de que haya interacción entre dos ligandos, sean A y B,

por los mismos sitios de una macromolécula R de modo que puedan fijarse

se ambos simultáneamente según el esquema.



De las ecuaciones de equilibrio en las que  $K_A$ ,  $K_B$ ,  $K_C$  y  $K_D$  son las - constantes de asociación, se cumple  $K_A \times K_C = K_B \times K_D$  de modo que si la fijación de un ligando facilita o dificulta la del otro, la recíproca también es cierta en el mismo sentido, se cumple:

$$(\bar{V}_A)_{B=0} = \frac{K_A (A)}{1+K_A (A)} \quad \text{y} \quad (\bar{V}_A)_{B \rightarrow \infty} = \frac{K_D (A)}{1+K_D (A)}$$

así si medimos  $\bar{V}_A$  en ausencia de B y a concentración del mismo que - saturate R., se cumple para la diferencia,  $\Delta \bar{V}_A$ ,

$$\Delta \bar{V}_A = \frac{K_A (A)}{1+K_A (A)} - \frac{K_D (A)}{1+K_D (A)}$$

De esta ecuación es posible el calcular  $K_D$  o constante modificada por otro ligando como se hará para CM modificado el ribosoma por PM.

e). Energías de fijación.- Conociendo las constantes de asociación K, calculamos las energías libres de fijación mediante la expresión  $\Delta G^\circ = - RT \ln K$ , en la que  $\Delta G^\circ$  es el cambio de energía libre standard, para una concentración unidad de los sitios, por mol de sitios de fijación.

#### Ensayo de reacción de fragmento.-

Sustancialmente se ha seguido el método de Monro y Marcker (1967) extrayendo el producto de la reacción con acetato de etilo (Leder y Burstzyn 1966). Se han empleado las condiciones iónicas y de pH standard: Tris-ClH pH 7,5 33 mM;  $(Ac)_2Mg$  13 mM; y ClK 270 mM con etanol a una concentración final de 33 % (v/v). Como sustratos se han emplea

do CACCA-Leu ( $^3\text{H}$ )-Ac ( o CACCA-Leu ( $^{14}\text{C}$ )-Ac) y PM.

PM así como los antibióticos inhibidores empleados se desecaron en los tubos previamente. Primeramente se comenzó la reacción añadiendo etanol y se paró la misma poniendo el mismo volumen de incubación de  $\text{SO}_4\text{Be}$  0.1 M saturado con  $\text{SO}_4\text{Mg}$ . Con objeto de evitar una posible fase latente requerida para que etanol modificara la conformación del ribosoma, influyendo en la reacción cuando se medía a tiempos muy cortos, ( aunque este periodo latente no se detectó en 20 segundos), se comenzó por preincubar los ribosomas en las condiciones iónicas y de etanol finales. Sobre PM y antibióticos cuando hubiera, se añadía una solución de CACCA-Leu-Ac en condiciones iónicas y de etanol finales, se disolvían aquellas y se comenzaba la reacción añadiendo la solución de ribosomas. Transcurrida la incubación ésta se detenía - añadiendo un volumen de  $\text{AcNa}$  0.3 M saturado con  $\text{SO}_4\text{Mg}$  a pH 5.5, que probamos inhibe totalmente posterior reacción. Si no se indican otras condiciones la reacción se ha hecho según estas últimas. Se ponían - controles sin PM para seguir el curso de la posible hidrólisis de - CACCA-Leu-Ac y otras reacciones secundarias, siempre se mantuvieron menores al 5 % de la reacción descontándose en todos los casos.

Los volúmenes de reacción fueron de 0.150 ml y 0.075 ml a los - que se añadió 0.100 ml de  $\text{SO}_4\text{Be}$  o  $\text{AcNa}$ . Se extrajo Ac-Leu-PM con 1.25 ml de acetato de etilo de los que se tomaba 1 ml en el que se medía

la radioactividad añadiendo 2 ml de un líquido de centelleo (preparado por disolución de 20 g. de BBOT ó de 5 g. de butil-PBD en 1 litro de tolueno mas 250 ml de 2-metoxietanol).

Los tiempos de incubación oscilaron entre 20 segundos y 10 min. trazando la curva de reacción y tomando la tangente en el origen como velocidad inicial. Las rectas de experimentos de cinética se ajustaron por el método de mínimos cuadrados, calculándose el coeficiente de correlación lineal y que en todos los casos superó el valor de - 0.980.

Método de incorporación de fenilalanina en sistema  $S_{100}$  de E.Coli

Se ha empleado el ensayo descrito por Nirenberg y Matthaei - (1961). En tubos en los que previamente se han desecado a vacío los antibióticos indicados se pusieron 0.100 ml de una solución conteniendo Tris-ClH pH 7,8 a  $5 \times 10^{-2}$  M,  $(Ac)_2Mg$   $1,5 \times 10^{-2}$  M, CLK  $3 \times 10^{-2}$  M,  $\beta ME$   $5 \times 10^{-3}$ , ribosomas de E. Coli a 1,5 mg/ml, PEP  $10^{-2}$  M, PK a 0.1 mg/ml, poli U a 0.5 mg/ml,  $(^{14}C)$  fenilalanil-tRNA 30.000 cpm/ml, GTP  $1,2 \times 10^{-3}$  M y extracto celular de E. Coli  $S_{150}$  el diez por ciento diluido en la solución de reacción. Se pusieron tubos controles - sin poli U. Se inició la reacción añadiendo el  $(^{14}C)$  fenilalanil-tRNA y GTP en solución. Después de la incubación a 37°C se añadió por tubo 0.01 ml de albúmina al 1% y 1 ml de TCA 5 % frío, con lo que pre-

cipitan las proteínas. Se pusieron las muestras 15 minutos a 90°C - para disolver ácidos nucleicos y se filtraron por filtros de fibra - de vidrio GF/C ó GF/B lavando con TCA el filtro varias veces. Los - filtros una vez secados totalmente en lámpara de infrarrojo se pusieron en tolueno con 5 % de butil-PBD y se midió radioactividad.

#### Preparación de ribosomas de E. Coli

Se partió de células de E. Coli MR 600, cepa que carece de ribonucleasa I, lo cual evita un riesgo de daño del RNA ribosómico. Estas fueron crecidas en cultivo continuo a 37°C en Microbiological Research Station, Porton, Gran Bretaña. Se recogieron en fase logarítmica de crecimiento, el cultivo se enfrió a 4°C, se sedimentaron a esta temperatura y se lavaron con solución conteniendo Tris-ClH 10 mM, (Ac)<sub>2</sub>Mg 10 mM a un pH de 7,4. Se volvieron a sedimentar y se congelaron rápidamente en porciones que se conservaron a -20°C.

El método seguido para la preparación de ribosomas es sustancialmente el descrito por Nishizuka y Lipmann (1966) siguiendo las posteriores modificaciones de Staehelin y col. (1969).

#### a) Ruptura de células y aislamiento de ribosomas.

Las células se trituran en mortero con alúmina en proporción de 2 gramos por gramo de células hasta consistencia pastosa. Seañadió - DNAsa purificada electroforéticamente (libre de RNAsas) con objeto -



de disminuir la viscosidad del medio y mejorar el rendimiento de ribosomas unidos a membranas, en la proporción de 3  $\mu$ g de DNasa por gramo de células. Se continuó la trituración a la vez que se fué añadiendo lentamente tampón A (Tris-ClH pH 7,5 10 mM,  $(\text{Ac})_2\text{Mg}$  10 mM,  $\text{AcNH}_4$  100 mM y  $\beta$ ME 5 mM) recientemente preparado hasta 20 minutos más en - que se añadió tampón A hasta 3 ml por gramo de células.

El extracto se centrifugó a 5000 g. durante 30 min. durante los cuales se separan la alúmina, las células intactas y grandes trozos de pared y membrana. La solución se centrifugó nuevamente para clarificarla de restos de membranas y otros residuos durante 30 min. a 30.000 g. obteniéndose así el extracto crudo  $S_{30}$ .

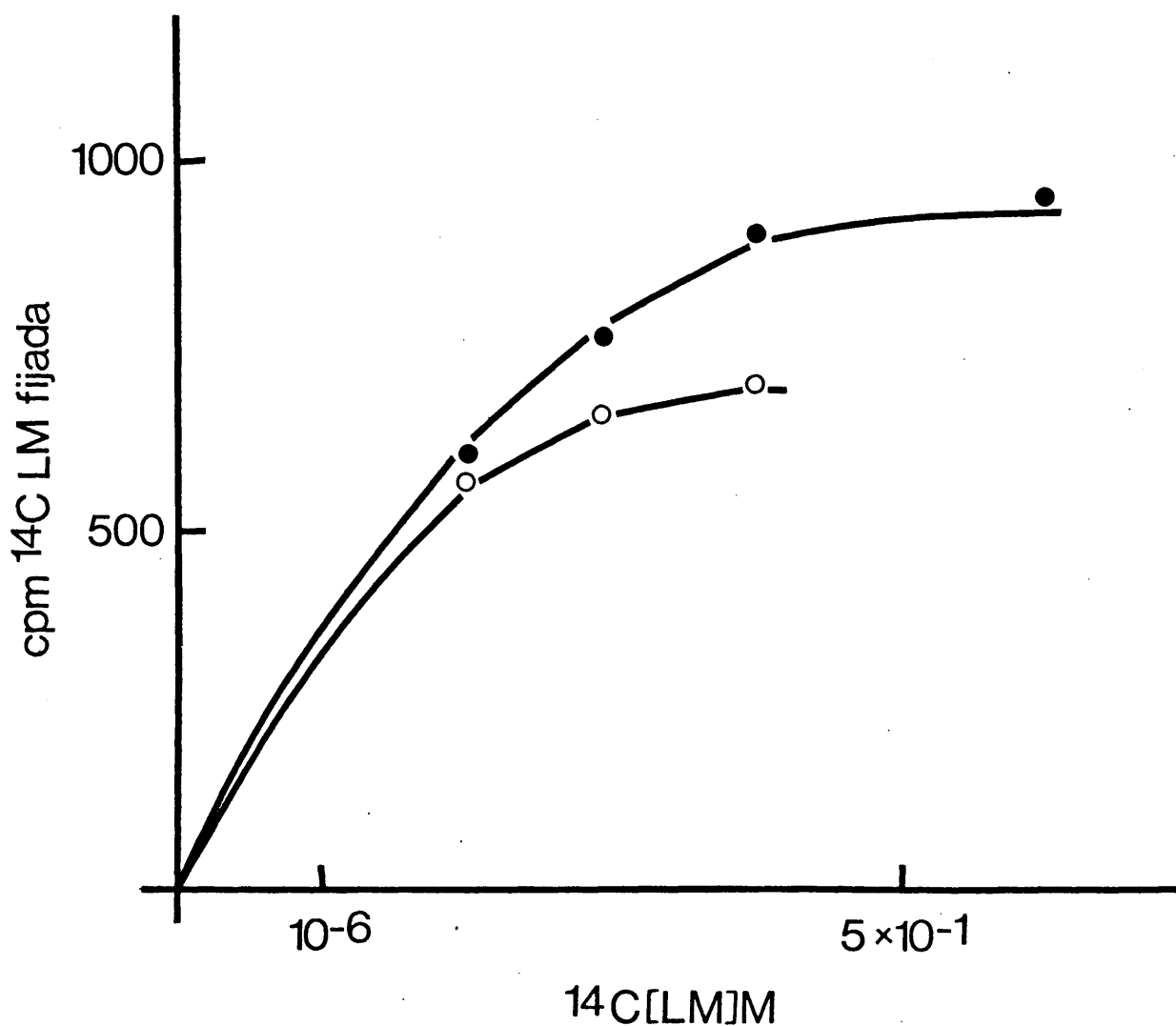
b) Purificación de ribosomas.

En este punto se han seguido dos variantes, la I procede a separar proteínas adheridas a ribosomas o tRNA y restos de mRNA, para lo cual tras sedimentar los ribosomas del extracto  $S_{30}$  durante 120 min. a 150.000 g. se resuspenden estos, una vez quitada la capa de proteínas que los cubre, en un tampón de baja concentración de iones  $\text{Mg}^{++}$  y alta de iones  $\text{NH}_4^+$  (Tris-ClH pH 7,5 10 mM,  $(\text{Ac})_2\text{Mg}$  1 mM,  $\text{AcNH}_4$  500 mM y  $\beta$ ME 5 mM). Se sedimentan agregados mediante una centrifugación a 30.000 g por 30 min. y recogen los ribosomas por sedimentación - otra vez a 150.000 g por 120 min. Después de lavar el sedimento con tampón A y quitarle la capa de proteína que la cubre se resuspenden

en un pequeño volumen de solución tampón C ( $(\text{Ac})_2\text{Mg}$  10 mM,  $\text{AcNH}_4$  100 mM, Tris-ClH pH 7,5 10 mM,  $\beta\text{ME}$  5 mM), ya que se conservan mejor concentrados, y se clarifican por ligera centrifugación a 2000 g por 10 minutos.

Con objeto de eliminar las cadenas peptídicas unidas al ribosoma como peptidil-tRNA si no se indica lo contrario se incubaron con 0.1 mM PM 10 min. a 37°C (Traut, Maden y Monro, 1968). Para eliminar la PM se dializaron a 0°C 8 horas frente a un exceso de 200 veces el mismo tampón. Este tratamiento al eliminar el peptidil-tRNA de algunos ribosomas produce un aumento en la fijación de algunos antibióticos, así CM y LM probablemente por impedimento estético de aquel, como por ejemplo se muestra en la figura M-I para LM.

El proceso de lavado se mejoró, y así se ha utilizado en la mayoría del trabajo presentado, este método aplicando la modificación empleada por Staehelin (1969). El extracto  $S_{30}$  se colocó cuidadosamente sobre igual volumen del tampón: Tris-ClH pH 7,5 20 mM,  $(\text{Ac})_2\text{Mg}$  20 mM,  $\text{AcNH}_4$  500 mM y  $\beta\text{ME}$  5 mM, en tubos de ultracentrífuga. Así se centrifugó durante 7 horas 30min. a 145.000 g. El sedimento se lavó y clarificó como se indicó anteriormente apreciándose menos contaminación de proteína que se retiene en la sacarosa. En este caso se incubó el extracto  $S_{30}$  previamente con PM 0.1 mM 30 min. a 37°C, en estas condiciones existe traslocación de peptidil-tRNA y mayor eficiencia



M-I Efecto del pretratamiento con PM en posterior fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas de E. Coli. Datos de un experimento de sedimentación con etanol. De ribosomas de un mismo lote una alícuota se trata 3 horas a  $0^\circ\text{C}$  con  $10^{-4}$  M de PM y luego se dializa frente a solución tampón standard durante 12 horas a  $0^\circ\text{C}$  (● — ●). Otra alícuota se somete a las mismas operaciones en ausencia de PM (○ — ○). Ribosomas de ambas alícuotas se ponen a 9 mg/ml en solución standard con 33 % de etanol. Se representa la fijación que hay en una alícuota de 0.1 ml.

cia en el tratamiento por PM.

Los ribosomas obtenidos por ambos métodos se distribuyeron en -  
pequeños volúmenes que se conservaron en nitrógeno líquido no conge-  
lándose otra vez ante de su uso. La concentración de ribosomas se mi  
de por densidad óptica a 260 mμ en la que tienen un coeficiente de -  
extinción tal que 17 mg/ml corresponde a 1 unidad de densidad óptica

#### Preparación de subunidades ribosómicas 50S.

Se empleó el método de Staehelin (1969) que sustancialmente con  
siste en someter a los ribosomas a bajas concentraciones de iones  $Mg^{++}$   
y altas de iones  $NH_4^+$  y posterior separación en gradiente de sacarosa

a) Disociación de partículas 70S.- El sedimento de ribosomas obteni  
do del modo indicado se resuspende en pequeño volumen de solución -  
tampón  $(Ac)_2Mg$  0.1 mM,  $AcNH_4$  500 mM, Tris-ClH pH 7,5 20 mM y a conti  
nuación se dializan durante 5 horas a 0°C frente a una solución  $(Ac)_2Mg$   
1 mM,  $AcNH_4$  500 mM, Tris-ClH 20 mM,  $\beta ME$  5 mM pH 7,5 cuidadosamente -  
ajustado ya que para valores menores de pH la separación de subunidada  
des no es tan buena. Se diluyen los ribosomas hasta 30 ml en el mismo  
tampón de modo que tengan una concentración final de 3 mg/ml. Sin -  
que sea mayor pues esto repercutiría en la pureza de 50S.

b) Separación de subunidades.- En tubos de rotor Spinco SW 25-2 ,  
se preparan gradientes lineales de sacarosa a partir de volúmenes igua

les de soluciones de esta al 25 % y 7 % en  $(\text{Ac})_2\text{Mg}$  1 mM,  $\text{AcNH}_4$  100mM Tris-ClH pH 7,5 10 mM y  $\beta\text{ME}$   $5 \times 10^{-3}$  M. Sobre este gradiente cuidadosamente se prepara otro con 10 ml de solución de sacarosa al 4 % en este tampón y 10 ml de ribosomas dializados en las condiciones anteriores.

La preparación de los gradientes se hizo en aparatos como los - descritos por Mc Conkey (1967), tras dejar estabilizar los gradientes una o dos horas se centrifugaron durante 16 horas a 24.000 rpm. a 2°C. Efectuada ésta tras proceder a recoger la banda de subunidades 30S que aparecen en la parte media baja del tubo con una pipeta en U si interesara, se descarta la solución que cubre el pequeño se dimento de subunidades 50S. Se lava éste ligeramente con agua para - disminuir sacarosa y posible resto de 50S y se resuspende en un pequeño volumen de la solución tampón C. A continuación se clarifican por centrifugación corta a 2000 g. y se descarta el sedimento. Se - mide la concentración por su densidad óptica, se toma una alícuota para analizar su pureza y se conservan en nitrógeno líquido sin perder su actividad en meses.

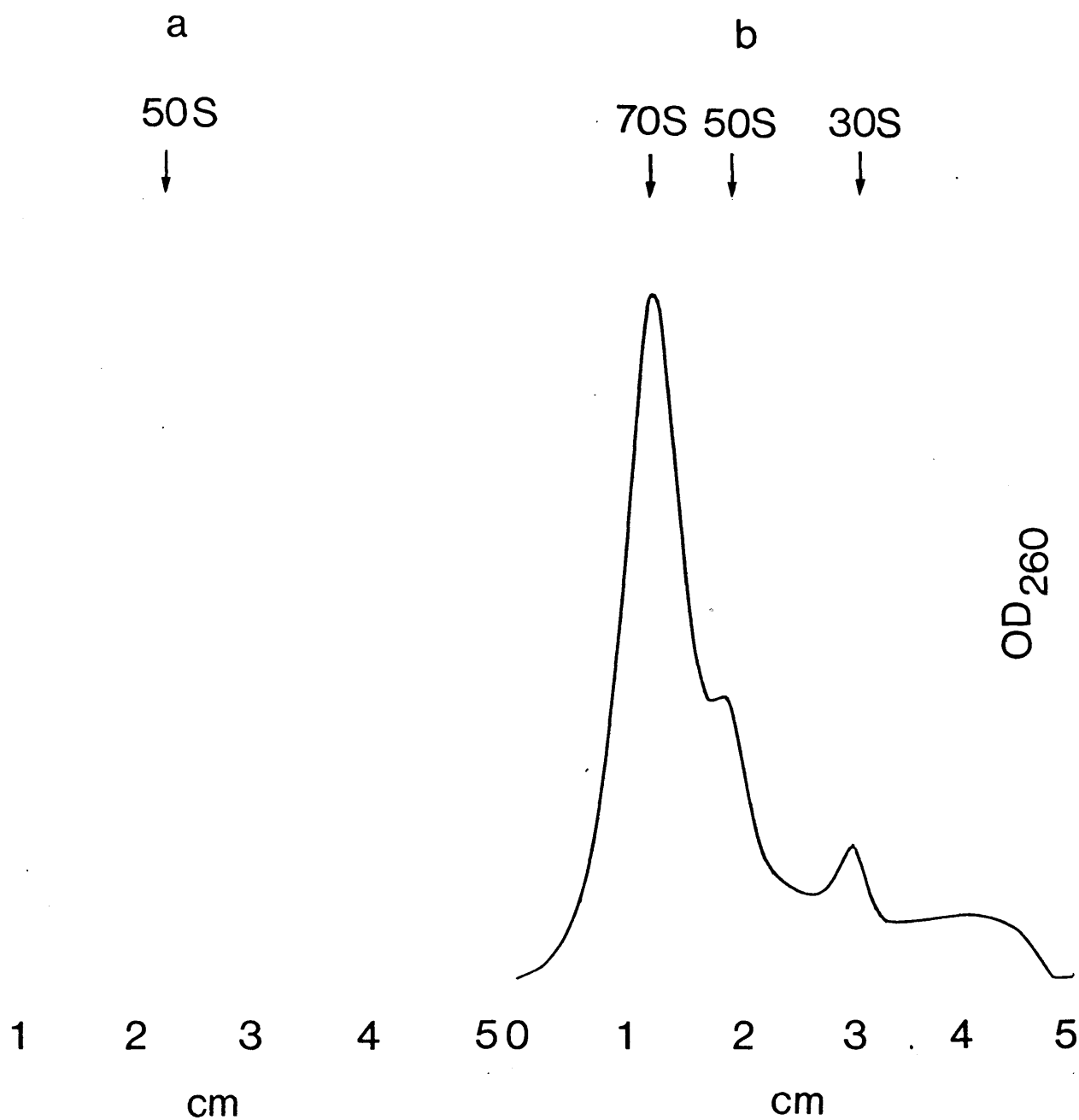
c) Prueba de pureza.- Se lleva a cabo por registro del perfil de - densidad óptica de un gradiente lineal de sacarosa sobre el que se - ha puesto una pequeña porción de 50S obtenidos. En tubos de 6 ml de rotor SW 50 de Spinco se forman gradientes lineales de 5 ml con solu

ciones de sacarosa de 20 % y 5 % en una solución de  $(\text{Ac})_2\text{Mg}$  1 mM,  $\text{AcNH}_4$  100 mM, Tris-ClH pH 7,5 10 mM que evitan agregados de subunidades. Sobre ellos se coloca cuidadosamente 0.1 ml de solución de 50S a 0.5 mg/ml en  $(\text{Ac})_2\text{Mg}$  0.1 mM,  $\text{AcNH}_4$  100 mM, Tris-ClH pH 7,5 10 mM.

Se centrifuga 90 min. a 150.000 g. a 2°C y se hace el perfil de absorción de densidad óptica en un espectrofotómetro Isco con registro. En la figura M-2 (a) aparece el perfil de un lote de 50S obtenidos. Puede apreciarse que la contaminación de 30S es muy baja y en general menor del 5 % de densidad óptica.

#### Preparación de ribosomas de B. Subtilis.

Las células de B. Subtilis W - 23 se cultivaron en Microbiological Research Station, Porton, Gran Bretaña. Nosotros hemos seguido el método descrito por Takeda y Lipmann (1966), ensayando el efecto de añadir varias concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  para obtener mejor lavado de ribosomas en actividad para fijación de antibióticos. La obtención de ribosomas se efectuó entre 0 y 7°C. Añadiendo a las células el triple de su peso de polvo de vidrio Balotini y el doble de solución tampón A ( $\text{Mg}^{++}$  10 mM,  $\text{NH}_4^+$  100 mM, Tris-ClH pH 7,4 10 mM y sin  $\beta$ ME) se trituran en un homogeneizador Virtis 9 a una velocidad aproximada de 40.000 rpm durante 9 min. interrumpiendo cada minuto para evitar que la temperatura suba de 7°C. Se extrajo la pasta obtenida por dos



M-2 (a) Pureza de 50S de E. Coli..- Perfil de un gradiente de - sacarosa lineal 20%, 5% en solución 0.1 mM  $(Ac)_2 Mg$ ; 100 mM  $AcNH_4$ ; - 10 mM Tris-ClH pH 7,5, de 0.05 mg de 50S obtenidos como se indica en métodos. Se centrifugó 90 min. a 150.000 g. y se leyó en espectrofotómetro Isco con registro.

(b) Estado de agregación de ribosomas 70S en la solución - tampón standard, 0.1 mg de 70S preincubados 15 min. a 0°C en solución tampón standard se pusieron en un gradiente como el de (a) en la misma solución standard. Se centrifugó 80 min. a 150.000 g. Se recogió como en (a).

veces con solución tampón A, centrifugamos el extracto 20 min. a - 10.000 g., descartamos el sedimento y la solución la centrifugamos a 30.000 g. 30 min. volviéndose a descartar este sedimento. El extracto  $S_{30}$  lo sedimentamos 120 min. a 150.000 g. El sedimento de ribosomas se resuspendió una parte ( 8/10) en tampón A y la otra (2/10) en tampón B (  $Mg^{++}$  1 mM,  $NH_4^+$  500 mM, Tris-ClH pH 7,4 10 mM y  $5 \times 10^{-3}$   $\beta$ ME) y paralelamente ambos resuspendidos se clarificaron por centrifugación 30 min. a 30.000 g., volviéndose a centrifugar las soluciones - 150 min. a 150.000 g. Ambos sedimentos se resuspenden en tampón A y se clarifican 15 min. a 2000 g. El rendimiento es de 2,5 % en peso. Se conservaron en nitrógeno líquido. La labilidad de estos ribosomas es grande a las concentraciones iónicas altas, así los ribosomas lavados a  $NH_4^+$  500 mM mostraban un 25 % menor capacidad para ( $^{14}C$ ) CM.

#### Preparación de ribosomas de Anacystis Montana.

Las células nos fueron donadas por el Dr. Rodriguez-López y fueron obtenidas según se describe por Rodriguez-López y Vázquez (1968) Las células se rompieron en un fraccionador Ribi a 30.000 Psi en una solución tampón  $(Ac)_2Mg$  10 mM,  $AcNH_4$  100 mM, Tris-ClH pH 7,5 10 mM. Los restos celulares sedimentan por centrifugación a 25.000 g. por 30 min. La solución se centrifugó por dos horas 150.000 g. y el sedimento tras resuspenderse en la misma solución tampón se volvió a centrifugar 2 h.



a 150.000 g. El sedimento se resuspendió en pequeño volumen del mismo tampón y se conservó en nitrógeno líquido.

Los ribosomas 80S de *Saccaromyces cerevisiae* nos fueron donados por E. Battaner.

Estado de agregación de los ribosomas en las condiciones iónicas standard.

Con objeto de conocer el estado de agregación de los ribosomas en nuestros ensayos de fijación hicimos la aproximación de poner en gradientes de sacarosa con las condiciones iónicas standard ribosomas preincubados en esas mismas condiciones y a 0°C. Dada la imposibilidad de con esta técnica obtener la resolución necesaria si empleamos una concentración de ribosomas similar a la de los ensayos de fijación, empleamos unas que son de 10 a 20 veces menores, aunque conscientes de que el estado de agregación probablemente tiende a la asociación al aumentar la concentración de las partículas. Nosotros con el fin de probar esto pusimos varias concentraciones de ribosomas, y aunque no obtenemos variación en la proporción relativa de 70S, 50S y 30S no es el resultado muy significativo dado el pequeño margen de concentraciones empleado.

En la figura M-3 puede verse como de esos perfiles en los que se observa un 75 % en densidad óptica corresponde a 70S y probablen

te, como hemos dicho sea mayor en las concentraciones usuales para - los experimentos de fijación.

#### Preparación de Leu-tRNA y fenilalanil-tRNA.

Se llevó a cabo por incubación de tRNA de E. Coli en presencia de aminoácido radioactivo, moléculas suministradoras de energía y - sintetasas de E. Coli del extracto  $S_{150}$  de esta bacteria.

Obtención de extracto celular  $S_{150}$ .- Se trituran con alúmina - 10 g. de células de E. Coli a 0°C como en la obtención de ribosomas. Se procede de la misma forma y una vez sedimentados los ribosomas es ta vez por centrifugación a 150.000 g. por 5 horas se toma la mitad o el tercio superior de la solución de los tubos, este extracto cons tituye el  $S_{150}$ . Contiene además de moléculas pequeñas, como aminoá c idos y nucleótidos, proteínas como son los factores T y G, así como las distintas sintetasas. Para eliminar los aminoácidos que alterarían la actividad específica del aminoácido radioactivo añadido, se diali z a esta porción por doce horas frente a 200 veces su volumen de una solución que contenía Tris-ClH pH 7,5 20 mM,  $Cl_2Mg$  10 mM, y  $\beta ME$  10 mM. El extracto  $S_{150}$  se dividió en alícuotas y se conservaron en nitroge n o líquido usándose en el momento de descongelarse.

Se le sometía a una prueba de capacidad de carga con el aminoá- cido o aminoácidos para los que se iba a utilizar dada la distinta -

labilidad de las sintetasas específicas de aquellas. Para ello se -  
añade tRNA y aminoácido radioactivo, se precipitan ácidos nucleicos  
mediante ácido tricloroacético 5 % frío y se filtran las suspensio-  
nes por discos de fibra de vidrio GF/B ó GF/C, estimándose en estos  
la radioactividad retenida que corresponde al tRNA cargado con aminoá-  
cido.

La solución de incubación contenía  $(Ac)_2Mg$  10 mM, CLK 100 mM, -  
Tris-ClH pH 7,5 50 mM, PEP 4 mM, PK 60  $\mu g/ml$ , ATP 2 mM, CTP 0.2 mM,  
 $\beta ME$  6 mM, aminoácido radioactivo  $6 \times 10^{-5}$  M aproximadamente y tRNA  
 $4 \times 10^{-5}$  M. A alícuotas de aproximadamente 0.1 ml se añadía el extrac-  
to  $S_{150}$  problema en proporción variable de 10 % a 30 % y se incubaba  
a 37°C por 10 a 15 min. Se detenía la reacción añadiendo TCA 5 % a -  
0°C en exceso, 1 a 2 ml y después de agitar se pasó por los filtros  
de fibra de vidrio indicados, lavando los tubos y los filtros con -  
TCA frío por tres veces. Se secaron éstos y se contó su radioactividad  
en líquido de centelleo tolueno 5% de butil-PBD. Se calcula la efi-  
ciencia de carga considerando la proporción de tRNA específico del -  
aminoácido ensayado y de la actividad específica de éste.

Reacción de carga de tRNA.- Una vez probado que las sintetasas  
para el aminoácido deseado son activas se procede a la reacción de -  
síntesis del aminoacil-tRNA. Para ello se incuba con el extracto  $S_{150}$   
tRNA ya deacilado o bien se hidroliza en el laboratorio con álcali -

( von Ehrenstein 1967), aminoácido radioactivo, ATP y su sistema re-  
generador PEP y PK a partir de ADP aunque se puede prescindir de él.  
Es necesario generalmente  $Mg^{++}$  tampón y  $\beta ME$  para proteger los grupos  
sulfidrilo de las sintetasas de oxidación. Así para ( $^3H$ ) Leucina, la  
solución de incubación contenía: Tris-ClH pH 7,5 50mM,  $(Ac)_2Mg$  10 mM  
CLK 100 mM,  $\beta ME$  6 mM, ATP 1 mM, PEP 5 mM, tRNA deacilado de 10 a 20  
mg/ml Leu( $^3H$ ) de 2 a  $5 \times 10^{-5}$  M y un 10 % aproximadamente del volu-  
men total de  $S_{150}$  de E. Coli. En otras incubaciones se prescindió de  
PEP y PK poniéndose entonces ATP a 3 mM. Se incuba la solución 15 min.  
a 37°C, un exceso de tiempo puede disminuir el rendimiento, y se toman  
muestras de densidad óptica y radioactividad como controles de rendi-  
miento posterior. Se enfría la solución a 0°C que añade un 10 % de -  
su volumen de AcNa al 20 % (p/v) pH 5,4.

Para desproteinizar la solución se le añade su mismo volumen de  
fenol saturado de agua que esté destilado recientemente. Se agita fuer-  
temente durante 10 min a 4 - 5 °C y se centrifuga la mezcla de 10 a  
20 min. a 4000 g. para separar las capas. Los ácidos nucleicos siguen  
disueltos en su mayor parte en la capa acuosa mientras que las proteí-  
nas se precipitan en la interfase. Se toma aquella y se vuelve a ex-  
traer de igual forma la capa fenólica con otro volumen de AcNa 20 %  
pH 5,4. Se juntan ambas capas acuosas y se precipitan los ácidos nu-  
cleicos añadiendo dos veces su volumen de etanol absoluto a -20°C. -

Se mantiene durante unas horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y una vez precipitados se centrifugan 15 min. a 5000 g., se decanta el líquido y el precipitado - se resuspende en etanol puro y se vuelve a centrifugar de la misma - forma. De este precipitado se elimina el etanol por evaporación a vaco hasta total sequedad. Se disuelve en un poco de agua y se miden densidad óptica y radioactividad; usualmente la recuperación del - tRNA es total y la carga se calcula teniendo en cuenta aquella, la - actividad específica del aminoácido usado y la eficiencia del contador. El aminoacil-tRNA se conserva en nitrógeno líquido.

#### Preparación de CACCA-Leu-Ac.

Las secuencias del extremo 3', al que va unido al aminoácido, - de los tRNA específicos para leucina son GCACCA-Leu y GUACCA-Leu. Si digerimos Leu-tRNA con ribonucleasa  $T_I$  que es una endonucleasa que - hidroliza específicamente enlaces internucleótidos entre el grupo - ácido guanílico en 3' y el hidróxilo en 5' del nucleótido adyacente. Se obtendrán los fragmentos CACCA-Leu y UACCA-Leu marcados en Leu. Cuando digerimos el Leu-tRNA obtenido según el apartado anterior tambien se obtendrán otros fragmentos de distintos tRNA aunque no estén marcados. Es necesario pues para obtener una preparación de gran pureza al someter el digerido a una purificación extensiva. Esta se - lleva a cabo por electroforesis de alto voltaje en papel como describi

biremos. En la solución de digestión se añade EDTA que estimula la acción de RNasa  $T_I$  probablemente por quelar los iones divalentes que son inhibidores del enzima ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ). Su pH óptimo es 7,5 pero para evitar hidrólisis de aa-tRNA la incubación se hace a pH 5,4 al cual su actividad es algo mayor que la mitad de la máxima.

Se hicieron pruebas para observar que concentración de enzima era la óptima para la obtención de CACCA-Leu observándose el digerido por autoradiografía. Se encontró que en la proporción 1/200 de enzima sustrato a los 30 min. a 37°C este en su totalidad se había transformado en los fragmentos anteriores casi en su totalidad.

Una solución standard contenía 15 mg de ( $^{14}C$ ) Leu-tRNA en un volumen de 0,5 ml, EDTA 2 mM, AcNa al 20 % (p/v) pH 5,4 al 2 % y RNasa  $T_I$  0.075 mg todo incubado a 37°C durante 30 min.

Acabada la introducción la solución se fraccionó por electroforesis de alto voltaje en papel Whatman 3 mm aplicando un campo de 50 volt/cm durante 180 a 240 min. en una solución tampón de piridina 0.5 % (v/v) ácido acético 5 % (v/v) en agua de pH 3,5. A este pH dados los pK de los distintos nucleótidos y de leucina (Smith, 1967), CACCA-Leu migra hacia el polo negativo, mientras que UACCA-Leu lo hace en dirección opuesta. En la figura Met-3 (a) puede observarse uno de los perfiles característicos tras una digestión completa de tRNA Leu. Se observa generalmente un pequeño pico al frente de CACCA-Leu

variable en proporción de unas preparaciones a otras que pudiera ser Leu. La proporción relativa de CACCA-Leu y UACCA-Leu depende de los distintos tRNA empleados.

La electroforesis se hizo en un aparato de planchas metálicas - refrigeradas en su interior por su serpentín de agua basado en el descrito por Ingram y Shetton (1962) bien con la tira de papel inmersa en un tanque lleno de un líquido no polar, compuesto de hidrocarburos de petróleo, refrigerado a su vez por un serpentín de agua. La solución se puso en el centro de la tira de papel seco y se fué mojando en la solución tampón por ambos lados de la muestra (Smith 1967).

Para localizar las distintas zonas de radioactividad se separa una tira de 0.5 a 1.0 cm de anchura, que se corta en fracciones de - 1 cm en las que se mide la radioactividad en tolueno 5% butil-PBD. Cuando la radioactividad proviene de  $^{14}\text{C}$  es posible detectarlos en - un contador Geiger.

Localizadas las zonas, se cortan y se eluyen con agua a 4° - 5°C por capilaridad. Estos eluidos se liofilizaron bien en liofilizador de vidrio acoplado a bomba de aceite con nieve carbónica y acetona 6 en un liofilizador de refrigeración eléctrica.

De estos fragmentos CACCA-Leu se acetilo en el  $\alpha\text{-NH}_2$  de leucina siguiendo básicamente el método de Haenni y Chapeville (1966). A un volumen de solución de CACCA-Leu, comprendido entre 0.2 y 0.5 ml se

le añade un tercio de su volumen de AcNa 1 M pH 5 y a continuación -  
manteniéndolo a 0°C cada 40 min. se añade 1/30 de volumen total de -  
anhidrido acético por cuatro veces. El producto de la acetilación se  
desechó a vacío en liofilizador y se resuspendió en agua sometiénolo  
a electroforesis con el mismo tipo de papel, solución tampón pH 3,5  
y campo eléctrico que anteriormente teniéndolo de 1 a 2 horas. En -  
figura M-3 (b) puede apreciarse un perfil característico. CACCA-Leu  
Ac al ser neutralizada la carga positiva de Leu migra ahora a más -  
velocidad en dirección al cátodo, mientras algo de UACCA-Leu C que -  
arrastra CACCA-Leu, lo hace en la misma dirección pero con mayor ve-  
locidad.

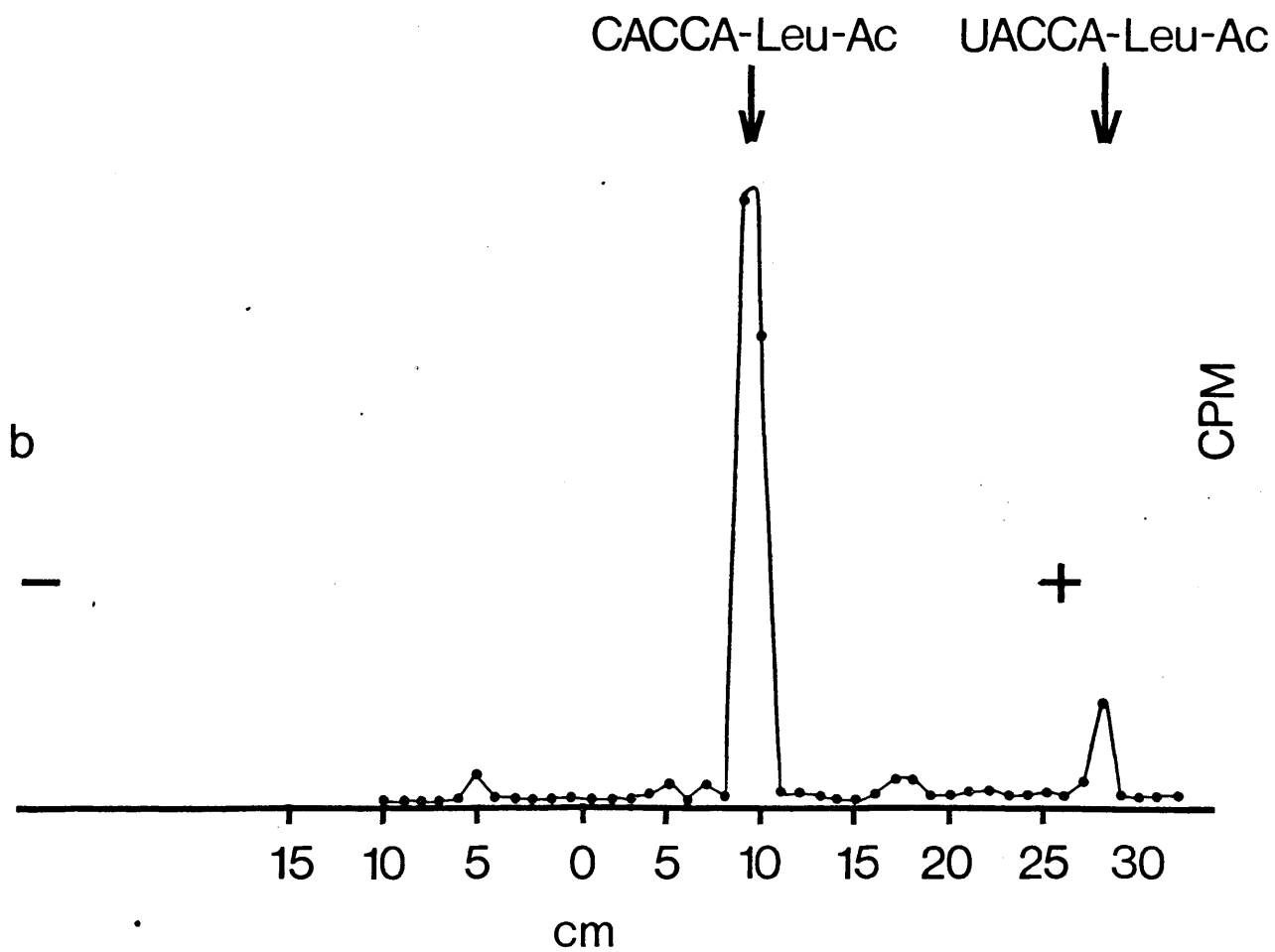
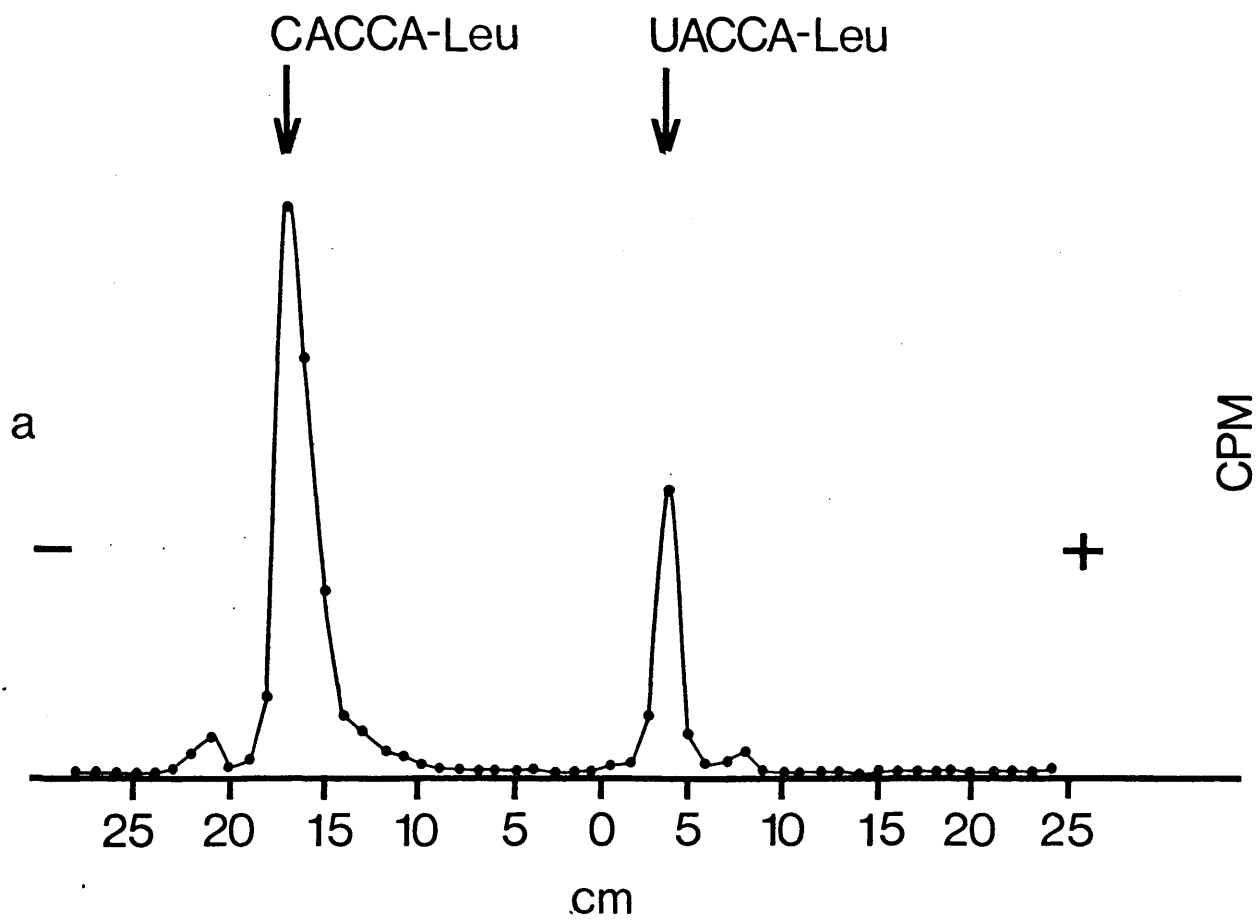
Hemos escogido CACCA-Leu por esta razón ya que al acetilarse el  
aminoácido y cambiar el sentido es probable que posibles nucleótidos  
que le acompañasen al no acetilarse vayan ahora en dirección opuesta  
a CACCA-Leu-Ac quedando éste mas puro.

Se localizó su zona, se cortó, eluyó y liofilizó como anterior-  
mente, conservándose en nitrógeno líquido.



M-3 (A) Digerido de Leu-tRNA con RNasa T<sub>I</sub> en condiciones descritas en métodos. Perfil de radioactividad de fragmentos de una tira de papel Whatman 3 mm de electroforesis a pH 3,5, en campo de 60 volt/cm por 3.5 horas en tanque.

(B) Pureza de CACCA-Leu-Ac.- Perfil de electroforesis en - mismas condiciones excepto que se tuvo 3 horas del producto de acetilación de CACCA-Leu aislado por la electroforesis anterior.



## Materiales

Acidos, bases y sales inorgánicas, etanol absoluto, tolueno y - otros disolventes de Merck grado analítico. Tris (hidrosimetil) aminometano, ATP, GTP, Acido poliurídilico, fosfoenolpiruvato, de Sigma CTP de Miles, tRNA de E. Coli B de General Biochemical y Schwarz,  $\beta$ -Mercaptoetanol de Serva. Puromicina de Nutritional Biochemical Corporation grado analítico y de grado farmacológico de Serva para tratamiento de ribosomas, butil PBD y BBOT de Ciba, CAB-O-SIL de Packard, - RNasa T<sub>I</sub> de Sankyo y Calbiochem, DNasa I de Sigma. Piruvatocinasa de Sigma.

Tubo de diálisis Visking de Serva. Filtros de nitrato de celulosa de Millipore. Filtros de fibra de vidrio GF/C y GF/C de Whatman: membranas para ultrafiltración Diaflo de Amicon.

Productos radioactivos: ( $^3\text{H}$ ) Leucina, ( $^{14}\text{C}$ ) Leucina, ( $^{14}\text{C}$ ) Fenilalanina, ( $^{14}\text{C}$ ) Cloramfenicol de Radiochemical Center, Amersham, - ( $^{14}\text{C}$ ) Lincomicina fue amablemente donado por el Dr. G. B. Whitfield (The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan U.S.A), asimismo ( $^{14}\text{C}$ ) Eritromicina por el Dr. R.E. McMahon (The Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana, U.S.A.). Del mismo modo ( $^{14}\text{C}$ ) Espiramicina I nos fue donada por la Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc - Paris.

El resto de antibióticos e inhibidores nos fueron donados por -

gentileza de :

D-treo Cloramfenicol por Dr. J. Erlich (Parke Davis and Co. U.S.A.)  
Lincomicina, Celesticetina, Clindamicina, Epiclindamicina y U24729A  
y Celesticetina por Dr. G.M. Savage (Upjohn Co. U.S.A.) Eritromicina  
por Lab. Abbot U.S.A., Espiramicina III, Neoespiramicina III y Foro-  
oidina III por Dr. A. Mc Fadzean (May and Baker Ltd. Gran Bretaña),  
Oleandomicina y Carbomicina por Dr. N. Belcher (Chas. Pfizer and Co.  
Inc. U.S.A.), Angolamicina por Dr. W. Keller-Schierlein (Laborato-  
rium für Organische Chemie, Zurich University, Switzerland), Virido-  
griseina por Dr. H. Ehrlich (Parke Davis and Co. U.S.A.), y Estrepto-  
graminas A y B por Dr. H.B. Woodruff (Merck Sharp and Dohme Research  
Laboratories, U.S.A.), Espiramicina, Amicetina y Pactamicina por Dr.  
Whitfield (Upjohn Co. Kalamazoo, U.S.A.) y Gougerotina de Calbiochem  
Siomicina por el Dr. K. Tanaka.

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

CM, cloranfenicol; LM, lincomicina; PM, puromicina; ER, eritromicina A; CL, clindamicina. Cuando se antepone ( $^{14}\text{C}$ ) o ( $^3\text{H}$ ) indica con el isótopo con el que está marcado y cuando ( $^{12}\text{C}$ ) o ( $^1\text{H}$ ) indica que es producto no marcado artificialmente. tRNA, RNA de transferencia o soluble; mRNA, RNA mensajero; aa-tRNA, aminoacil-tRNA; Fmet, N Formilmetionina.

Leu, leucina, Phe, fenilalanina; Ac-Leu, N Acetil - leucina; Ac aa-tRNA,  $\propto$  N Acetil-aminoacil-tRNA; CACCA, UACCA, CCA, CA, (CpApCpCpAp UpApCpCpAp, CpCpA, CpA) nucleósidos unidos por fosfatos entre hidroxilo 5' del de la izquierda y el 3' del inmediato de la derecha; - Ac-Leu-PM,  $\propto$  N Acetil-leucil-NPuromicina; Poli U, ácido poliuridílico; Poli A, ácido poliadenílico; DNasa desoxiribonucleasa; RNasa, ribonucleasa; PK, piruvato cinasa.

GTP, guanosintrifosfato; GMPPCP, análogo de GTP con un grupo etilén entre los fosfatos beta y gamma; ATP, adenosintrifosfato;  $\beta$ ME,  $\beta$  mercaptoetanol; EDTA, sal disódica del ácido etilén diamino tetraacético; EtoH, etanol; Tris, Tris(hidroximetil) aminometano; K, constante de asociación;  $K_d$ , constante de disociación ( $-\frac{1}{K}$ ); butil-PBD, 2-(4'-t-Butilfenil) - 5 (4'' difenil) 1,3,4, oxadiazol; cpm, pulsos de radioactividad detectados por minuto.

O.D.<sub>260</sub>, densidad óptica a longitud de onda de 260 mμ; 70S, 50S, 30S, partículas con un coeficiente de sedimentación en agua a 20°C de esas unidades Svedberg.

## RESULTADOS Y DISCUSION

## Capítulo I

### FIJACION DE CLORAMFENICOL A RIBOSOMAS DE ESCHERICHIA COLI, BACILLUS SUBTILLIS Y ANACYSTIS MONTANA.

Según se dijo en la introducción la primera parte de este trabajo consiste en la caracterización de la fijación de CM a ribosomas - de células procarióticas. Se ha elegido E. Coli para este estudio, - dado que existe abundante bibliografía sobre propiedades físicas y - naturaleza química y genética de sus ribosomas, pero a la vez se han realizado pruebas paralelas en una bacteria Gram positiva, Bacillus Subtilis y en un alga azul Anacystis Montana, con el objeto de tener un criterio comparativo que nos permita correlacionar los resultados de nuestros sistemas in vitro, con la actividad in vivo.

Ya se ha descrito en E. Coli K 12 (Das, Goldstein, Kanner 1966) y por (Wolfe y Hahn 1965) que CM se fija a ribosomas hasta una cantidad total correspondiente a un número medio de una molécula por partícula, en el margen de concentraciones en que aumenta su inhibición de síntesis de proteínas in vivo. También se observó que a más altas concentraciones existe una fijación adicional. (Das, 1966).

Estas experiencias no son exclusivas de que exista en los ribosomas un sólo tipo de fijación, es decir una afinidad uniforme para CM. Con el propósito de conocer este punto y el de medir esta afinidad o afinidades hicimos la representación de las curvas isotermas -



de fijación.

Para su trazado, dados los inconvenientes y ventajas diferentes de los diversos métodos experimentales procuramos el realizarlo por varios de ellos cuando fuera posible.

En el caso de CM se hizo, por equilibrio de diálisis, ultrafiltración a presión por membranas Diaflo y ultracentrifugación.

Por último, tras saber la modificación introducida por el etanol en esta fijación se representó la isoterma en estas condiciones cuyos valores comparamos con los datos cinéticos de reacción de fragmento. Así en la figura I-I puede verse la isoterma de fijación a 0°C, en representación de Scatchard por el método de ultrafiltración en membranas Diaflo X M 50 y otra, mediante una prueba de diálisis.

Puede observarse la clara linealidad de estas gráficas, lo que significa homogeneidad en cuanto a afinidad por CM dando unos valores para la constante de disociación de  $K_d 0^\circ = 0,9 \times 10^{-6}$  en la de diálisis. En cuanto al número de sitios de fijación es muy próximo a uno por ribosoma en los ensayos de ultrafiltración ( 0,87 en figura I-I ) siendo algo menor en los de diálisis debido a la lenta degradación de los ribosomas durante el tiempo preciso para alcanzar el equilibrio en estas pruebas ( 0,75 en figura I-I ).

En la mayoría de las gráficas puede apreciarse una fijación de afinidad al menos un orden de magnitud menor que la que aparece a -

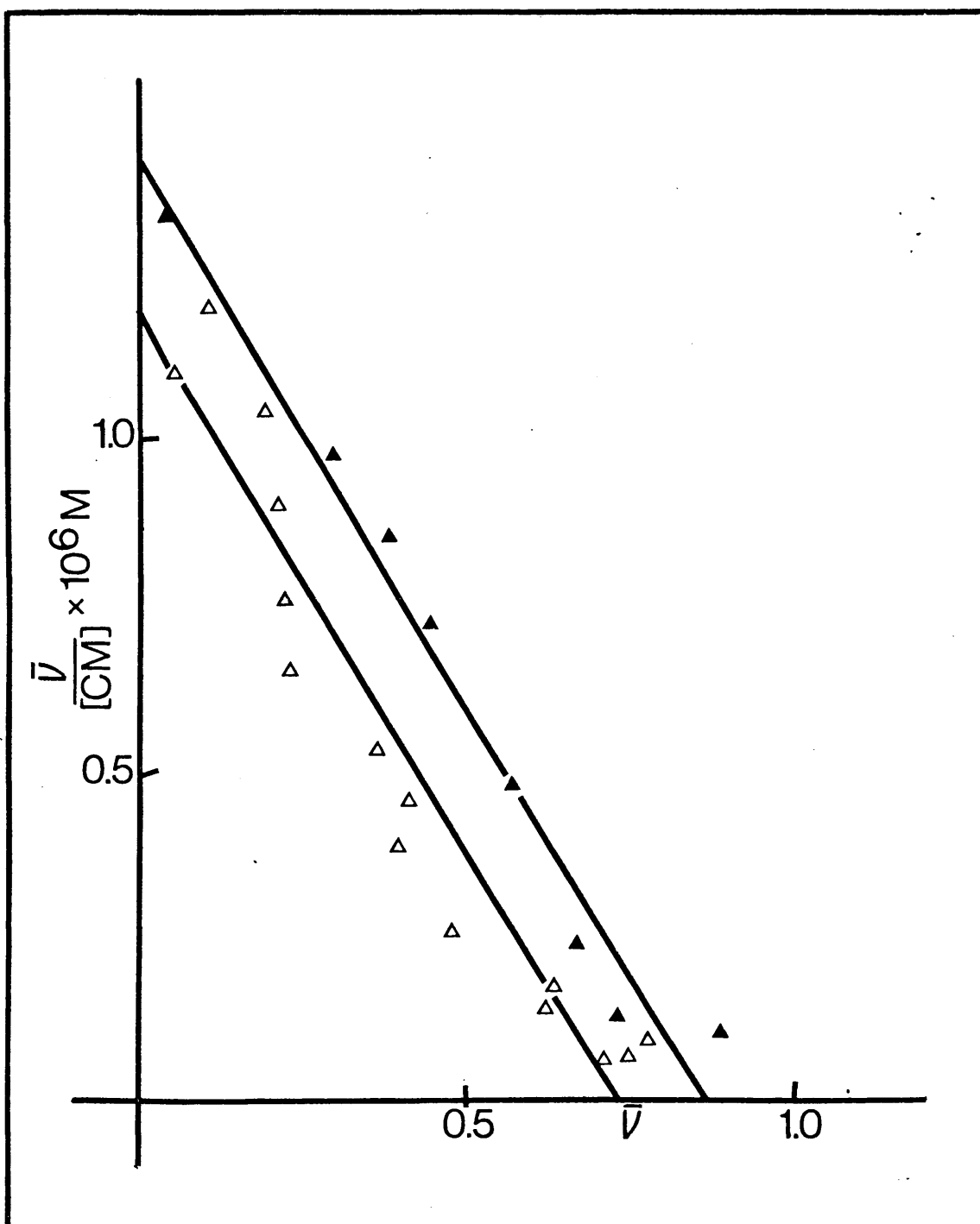


Figura I-1. Representación de Scatchard de fijación de  $(^{14}\text{C})\text{CM}$  a ribosomas 70 S de *E. Coli*. Datos de experiencias de filtración por membranas Diaflo (▲-▲) y de diálisis en equilibrio (Δ-Δ), descritas en Métodos. En el experimento de filtración la concentración de ribosomas ha sido de 5 mg/ml y la de  $(^{14}\text{C})\text{CM}$  de  $5 \times 10^{-7}\text{ M}$  a  $8 \times 10^{-6}\text{ M}$ ; en el de diálisis respectivamente eran de 10 mg/ml y de  $5 \times 10^{-8}$  a  $13 \times 10^{-6}\text{ M}$ .

baja saturación, esta fijación aparece a unas concentraciones de antibiótico ya saturante en su efecto inhibidor, de formación de enlace peptídico.

También hicimos ensayos por ultracentrifugación pese al riesgo previsible de que aparecieran alteraciones del equilibrio inicial durante la centrifugación como se ha indicado en la sección de métodos. Como puede apreciarse en la figura I-2 existe una linealidad satisfactoria a baja saturación dando  $K_d \text{ } 0^\circ = 1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  que está dentro del margen de variación de los otros métodos; así se acompaña en la misma figura de otro experimento de diálisis, como comparación en las condiciones iónicas que empleamos, dada la relación de iones monovalentes a divalentes,  $K^+$  y  $Mg^{++}$ , es de esperar que los ribosomas se encuentren en equilibrio 70S 50S 30S.

Nosotros intentamos una aproximación semicuantitativa para conocer las proporciones de las distintas partículas en estas condiciones poniendo sobre gradientes de sacarosa en solución standard ribosomas preincubados en esta solución. Del perfil de estos gradientes, hechos a distintas concentraciones de ribosomas, se deduce que el 80% aproximadamente de los ribosomas está en forma de 70S. Teniendo en cuenta la gran dilución respecto a las condiciones usuales de ensayos de fijación de los ribosomas, podemos suponer que principalmente medimos

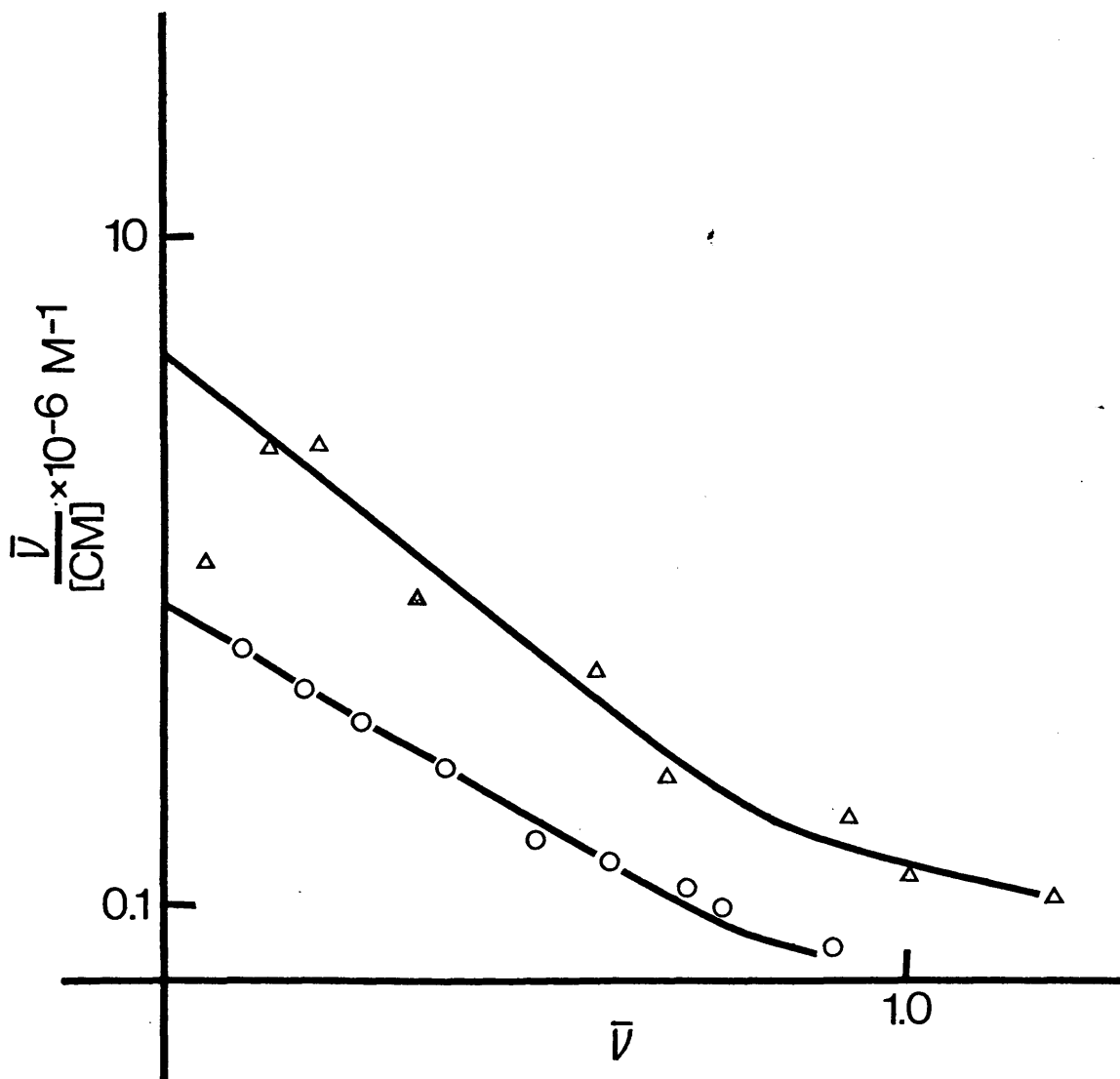


Fig. I-2. Representaciones de Scatchard de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM a ribosomas 70S de E. Coli. Datos de experimentos de ultracentrifugación midiendo radioactividad en solución ( $\Delta$  —  $\Delta$ ) y de diálisis en bolsas (O — O). En ambos casos la concentración de ribosomas fue de 10 mg/ml, empleándose ( $^{14}\text{C}$ ) CM en concentraciones comprendidas entre  $3 \times 10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M. En el primer experimento se incubó la solución 30 minutos a  $0^\circ\text{C}$  y se centrifugó 2 horas a 150.000 g., en el segundo se dializaron las bolsas con agitación 13 horas a  $0^\circ\text{C}$ .

fijación a partícula 70S.

Para observar el efecto que la subunidad 30S podría producir al unirse a la 50S en la fijación de CM así como para saber si la presencia de 50S, podría suponer la existencia de otra afinidad distinta para CM, aunque detectable por nuestros métodos, hicimos ensayos de fijación a 50S.

Con 50S separados hasta una pureza mayor de 95% se hizo el ensayo de diálisis que aparece en fig. I-3. La curva de Scatchard muestra una afinidad similar, quizás algo mas baja con  $K_d \text{ } 0^\circ\text{C} = 10^{-6} \text{ M}$ , a la de 70S. El número de sitios 0,7 también acusa las desfavorables condiciones iónicas del proceso de separación de subunidades.

Así pues parece que no hay diferencia sustancial en la afinidad por CM entre 70S y 50S y difícilmente podría reflejarse en nuestras representaciones.

Siguiendo nuestra pauta de correlacionar nuestros resultados de fijación con las condiciones de reacción de PM con fragmento pasamos a observar el efecto de etanol, en la fijación de CM.

Ensayando las concentraciones de 33% y 50% (v/v) de etanol, así como control sin etanol, puede observarse tal como lo expresa la figura I-4 que sustancialmente el alcohol no hace variar el número de sitios de fijación aunque disminuye la afinidad. Este resultado sugiere que el etanol no produce una alteración sustancial en la fija

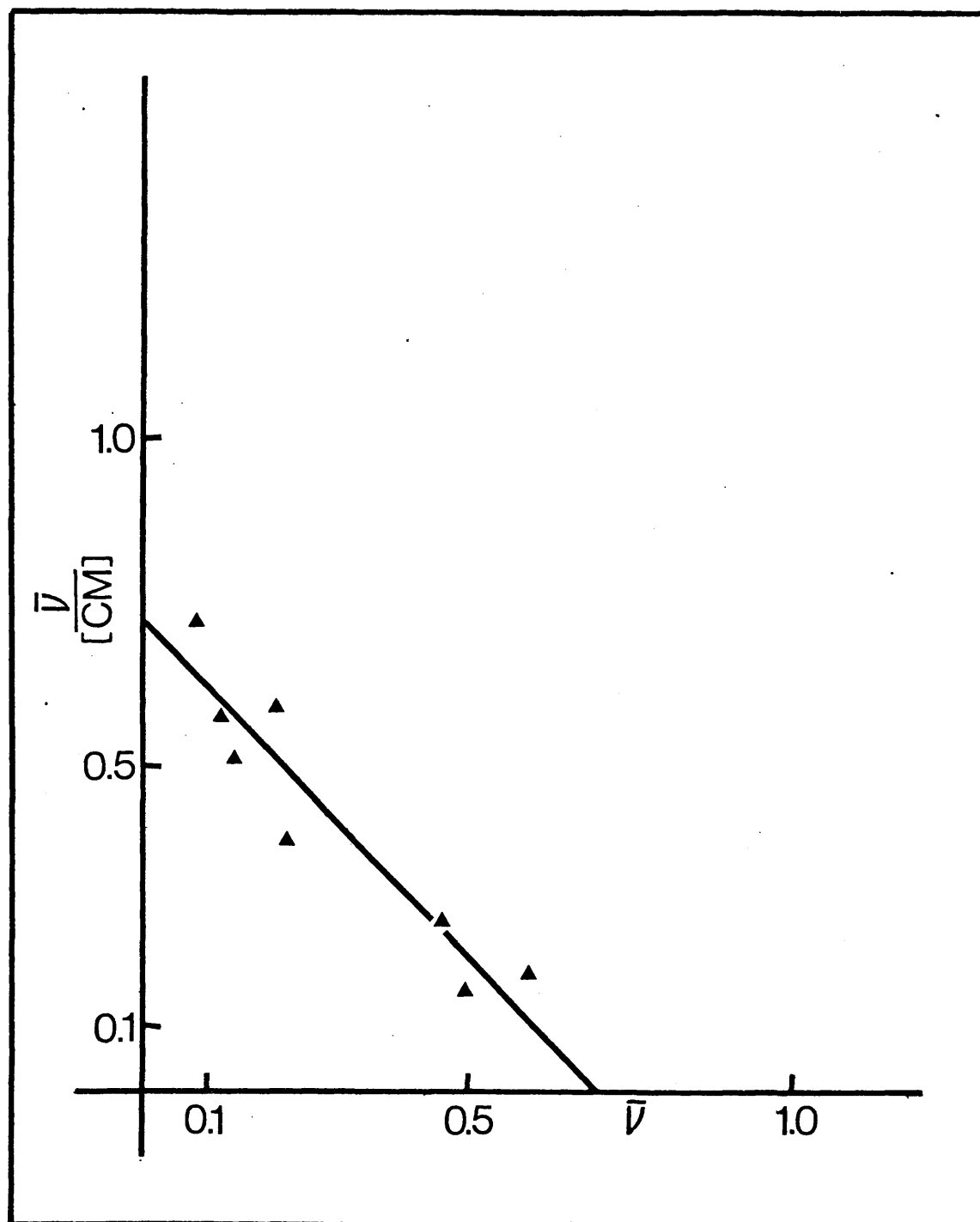


Figura I-3. Representación de Scatchard de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM a subunidades 50 S de E. coli, de un experimento de diálisis en equilibrio con un tiempo de incubación de 8 horas con agitación fuerte. La concentración de 50 S fué de 3.5 mg por ml y 5.2 mg por ml en diferentes bolsas; la concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) CM varió entre  $10^{-7}$  y  $5 \times 10^{-6}$  M.

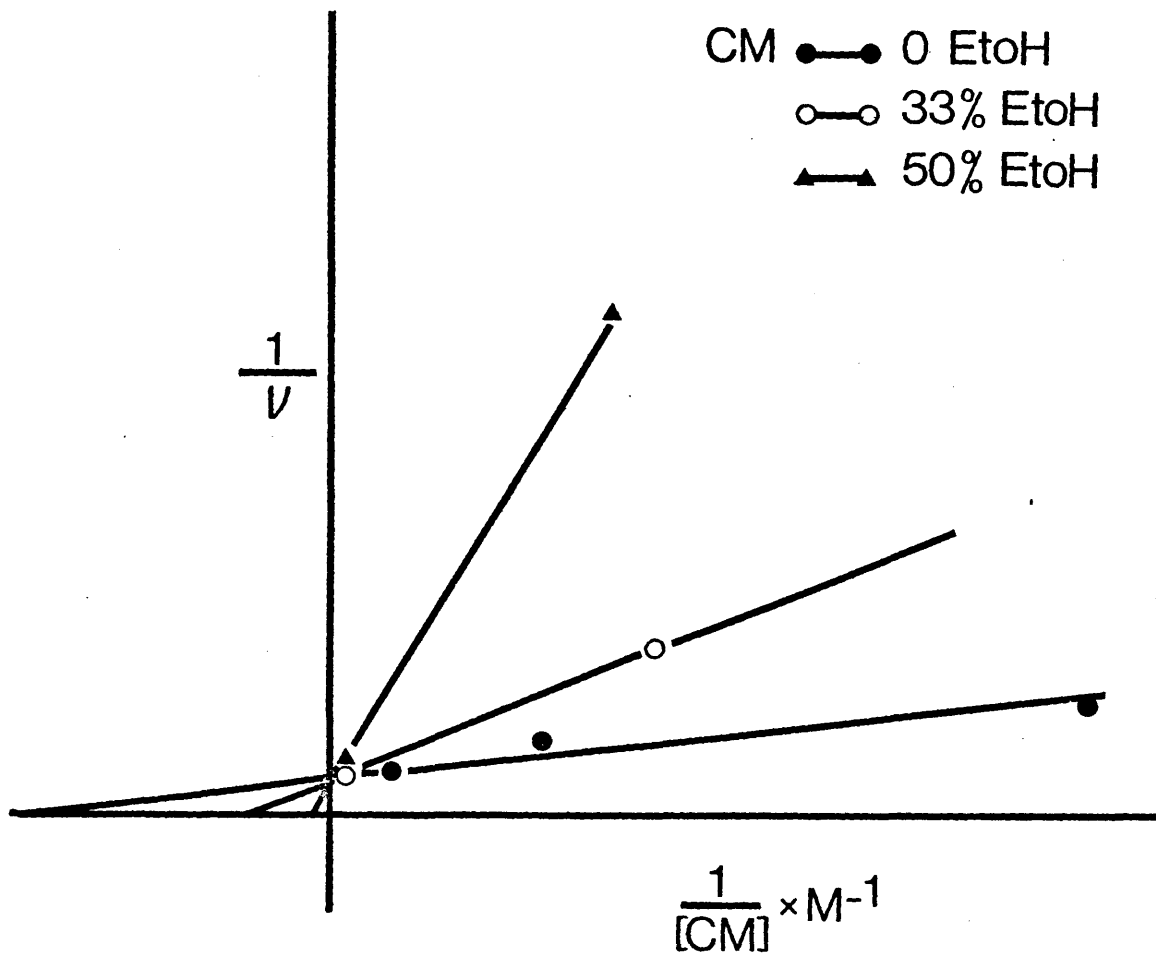


Fig.I-4. Representaciones recíprocas ó de Klotz para fijación de ( $^{14}C$ ) CM a 70S de E. Coli. Experimentos de sedimentación en presencia de etanol y de diálisis en bolsas (● — ●). La concentración de ribosomas fue de 10 mg/ml y las concentraciones de ( $^{14}C$ ) CM de  $3 \times 10^{-7}$  M a  $3 \times 10^{-6}$  M. Condiciones standard.

ción de CM a los ribosomas exponiendo más sitios, o bien haciéndolos inasequibles, sino que solamente varía la afinidad como cabría esperar de cualquier agente modificador de las características dieléctricas del medio.

Se hizo a su vez una prueba de reversibilidad de fijación de CM en presencia de etanol por si este modificara la ya evidenciada preliminarmente (Vázquez 1967) y confirmada por las formas de las isothermas en ausencia de etanol. El ensayo consistió en diluir el CM radioactivo una vez fijado con no marcado y observar la reducción total de la fijación como se observa en la tabla I-I.

El que el etanol en nuestras condiciones no distorsione la fijación CM se confirma a su vez por el efecto que produce en ribosomas de B. subtilis y A. Montana, como veremos en este capítulo en las que igualmente que en E. Coli el etanol no modifica la fijación preferente de una molécula por ribosoma.

Una vez comprobada en que consiste la variación de fijación con el alcohol procedimos a estudiar con más detalle la forma de esta isoterma de fijación. Como muestra la figura I-5 sigue apareciendo la fijación preferencial de una molécula de antibiótico por ribosoma y la fijación de menor afinidad a altas concentraciones de antibiótico como aparecería en las gráficas anteriores. Para la fijación principal la constante de disociación,  $K_d$   $0^{\circ}\text{C} = 2,45 \times 10^{-6}$  M es sólo un -



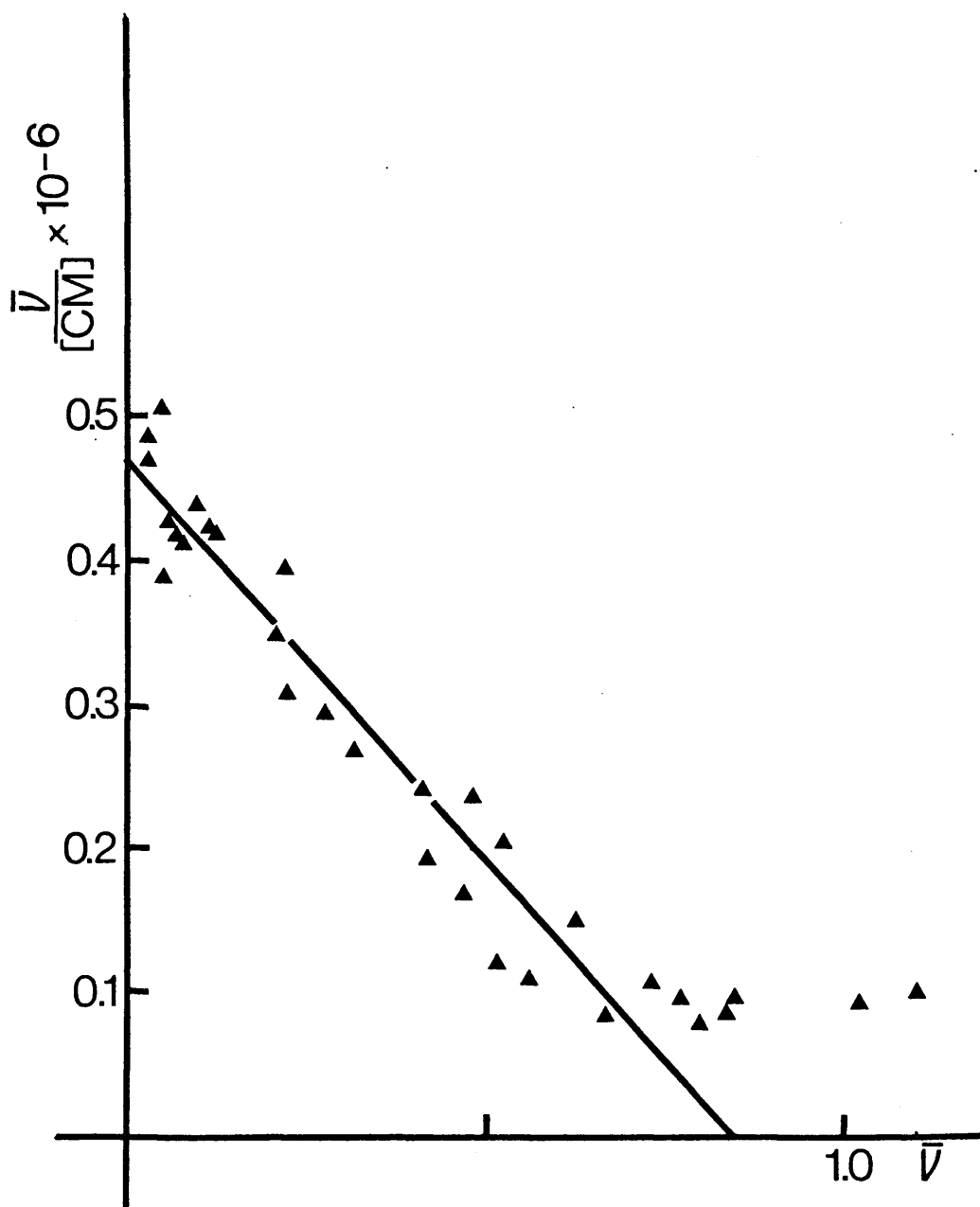


Figura I-5. Representación de Scatchard por fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM a ribosomas 70 S de *E. coli* en presencia de etanol por el método de sedimentación descrito en Métodos. Tiempo de incubación a  $0^{\circ}\text{C}$  de 30 min. La concentración de ribosomas fué de 4.4 mg por ml para tubos que contenían ( $^{14}\text{C}$ ) CM de  $2 \times 10^{-7} \text{ M}$  a  $4 \times 10^{-6} \text{ M}$  y de 8.8 mg por ml para otros conteniendo de  $6 \times 10^{-6} \text{ M}$  a  $10^{-5} \text{ M}$ .

con los mismos ribosomas a igual concentración, concentraciones crecientes de CM sobre velocidad inicial de reacción de PM con CACCA-Leu Ac. El resultado aparece en la figura I-6. A una concentración de CM de  $10^{-4}$  M, hay total inhibición de la reacción; a esa concentración de CM corresponde, aplicando la  $K_d$  de la fijación principal, una saturación,  $\bar{v}$ , entre 0,95 y 1. Así pues el resto de fijación correspondiente principalmente a la secundaria ya no tiene efecto. Esto - probablemente corresponde a la segunda fijación, inactiva in vivo observada anteriormente. (Das, Goldstem y Kanner 1966).

En distintas preparaciones de ribosomas hemos observado una correlación entre la pérdida de actividad para diversas funciones, fijación de fragmentos etc., con el aumento de esta fijación residual por todo ello creemos que no tiene significación in vivo en formación de enlace peptídico.

También en este sistema hemos probado si existe distinta afinidad entre 70S y 50S. Con 50S de gran pureza (ver métodos) hicimos en sayo en paralelo con los 70S de procedencia. El resultado es similar al obtenido en ausencia de etanol, vemos que la presencia de etanol a esta concentración de 33% no altera cualitativamente los resultados obtenidos en su ausencia.

Efecto de lincomicina en la fijación de cloranfenicol a ribosomas

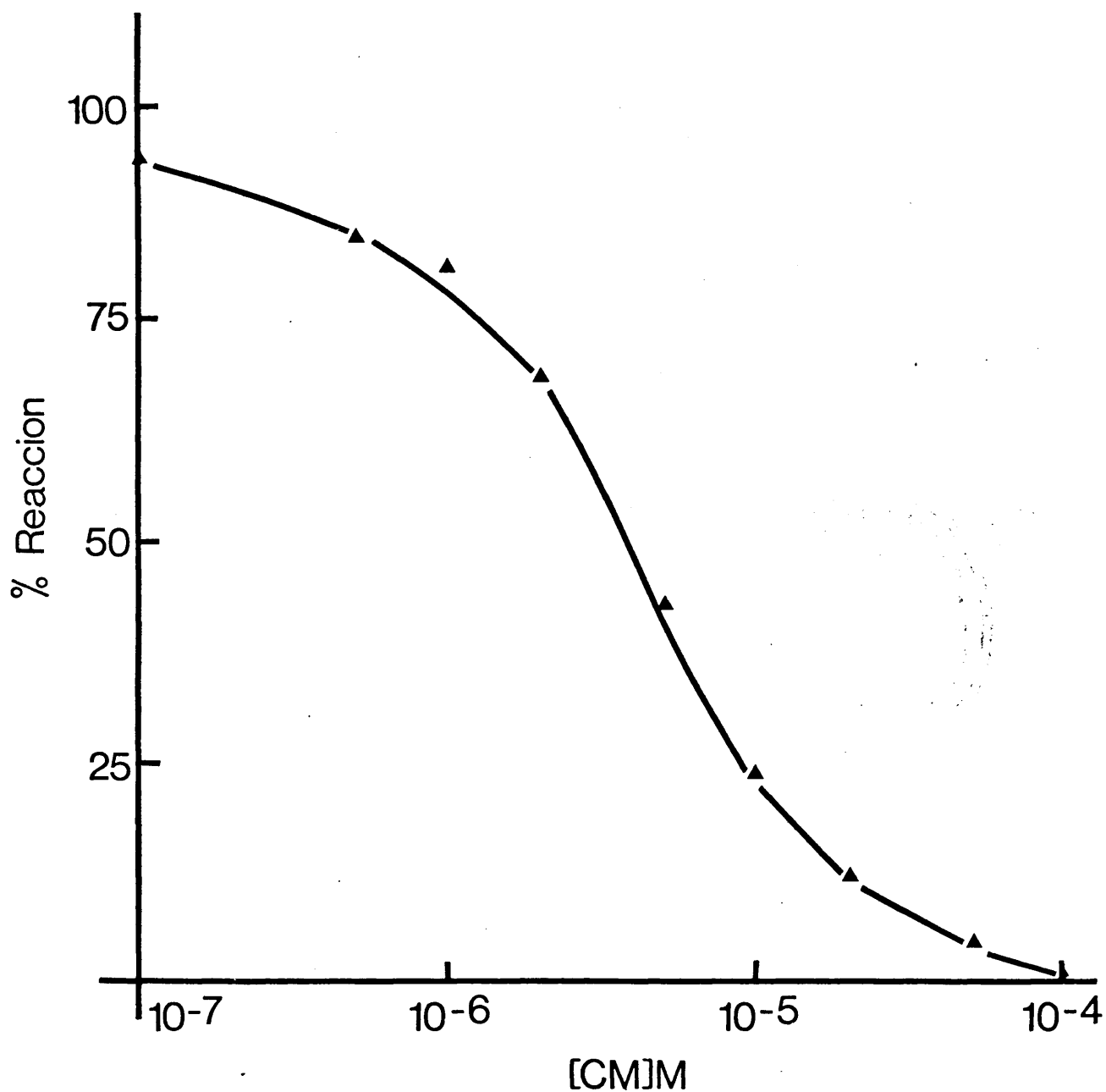


Fig. I-6. Inhibición de reacción de fragmento entre CACCA ( $^{14}\text{C}$ ) Leu-Ac y PM por CM. La concentración de ribosomas es exactamente la misma que la empleada en el experimento de fijación I-5. La reacción se hizo en condiciones standard con  $5 \times 10^{-4}$  M de PM, tomándose medidas a los 5 minutos de incubación, cuando esta es en fase lineal.

de Escherichia Coli.

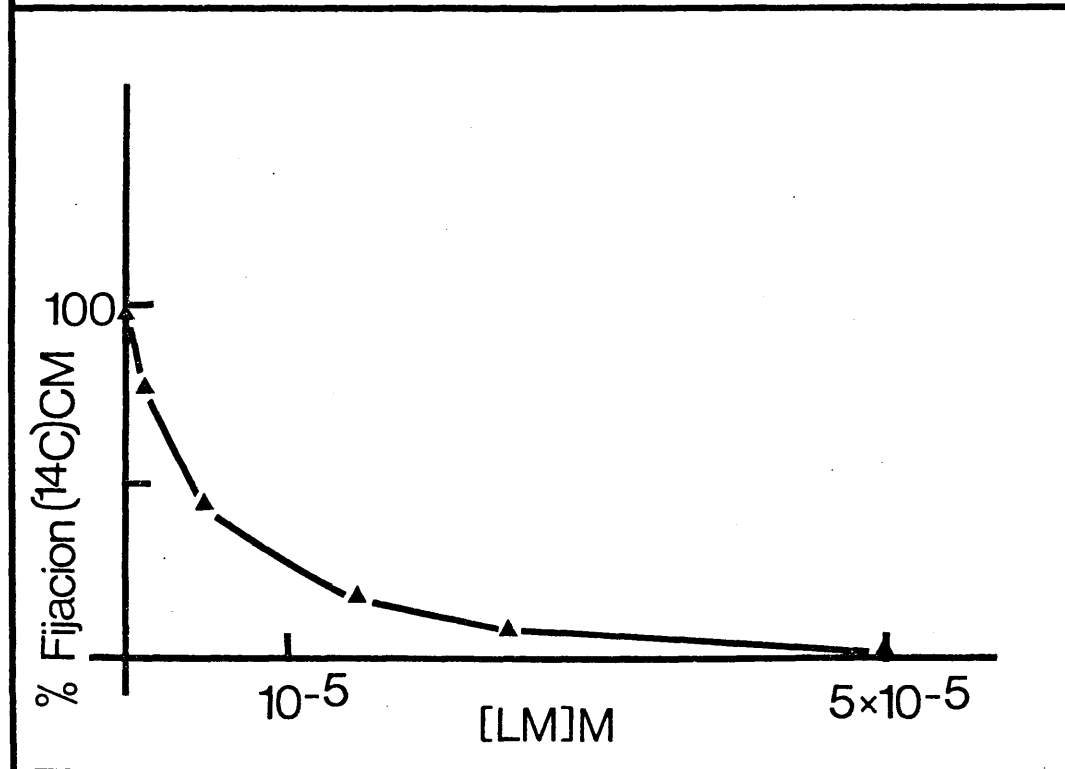
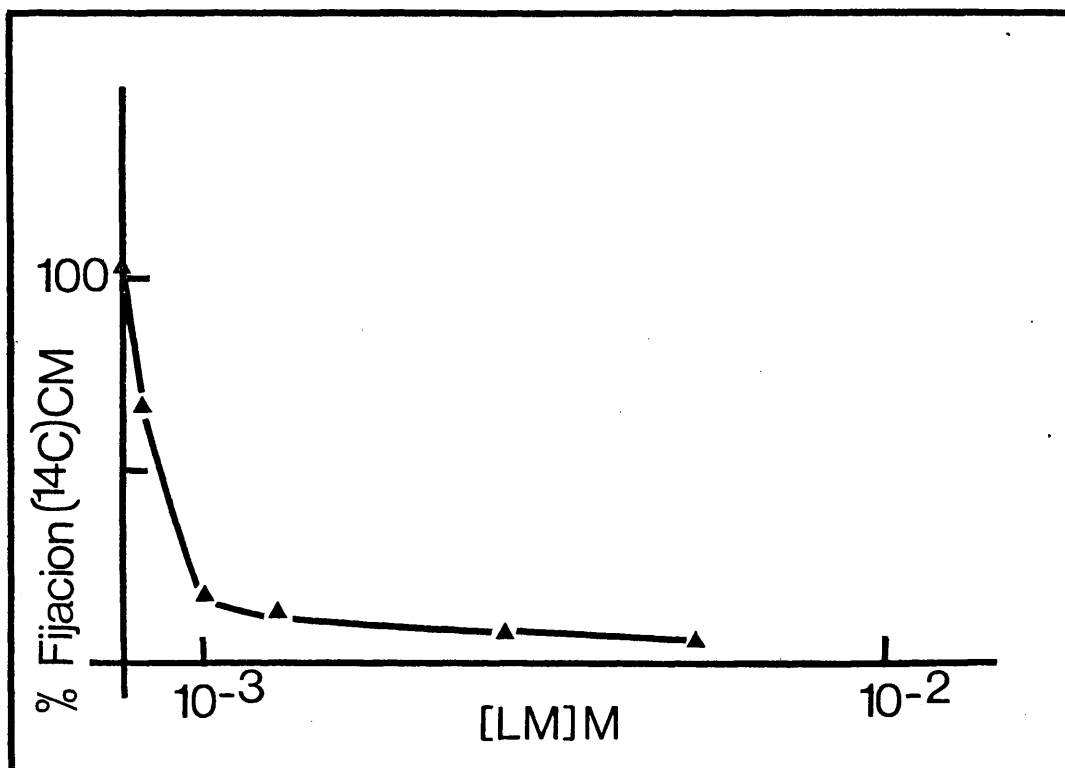
Es sabido que lincomicina es inhibidor de biosíntesis de proteinas en células procarióticas y que tiene localizada su acción en la subunidad 50S de los ribosomas. (Monro, Fernandez-Muñoz, Celma y Vázquez, 1970). Es también conocido que lincomicina inhibe la fijación de  $^{14}\text{C}$  CM a ribosomas (Vázquez, 1966).

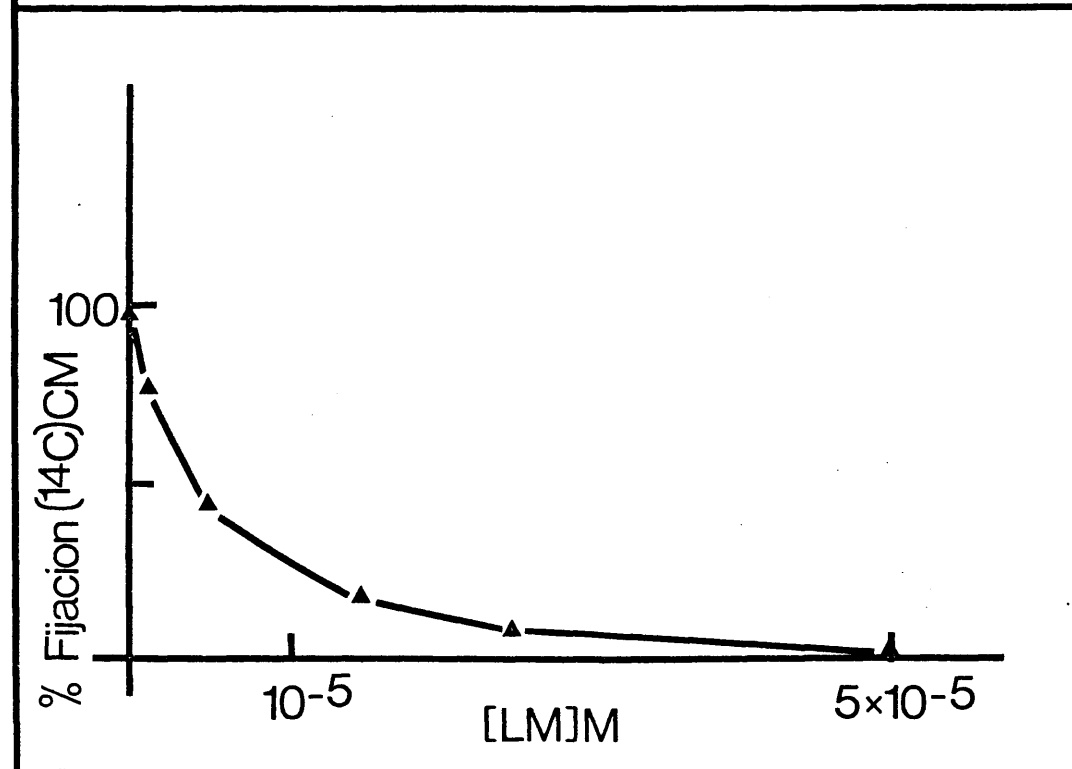
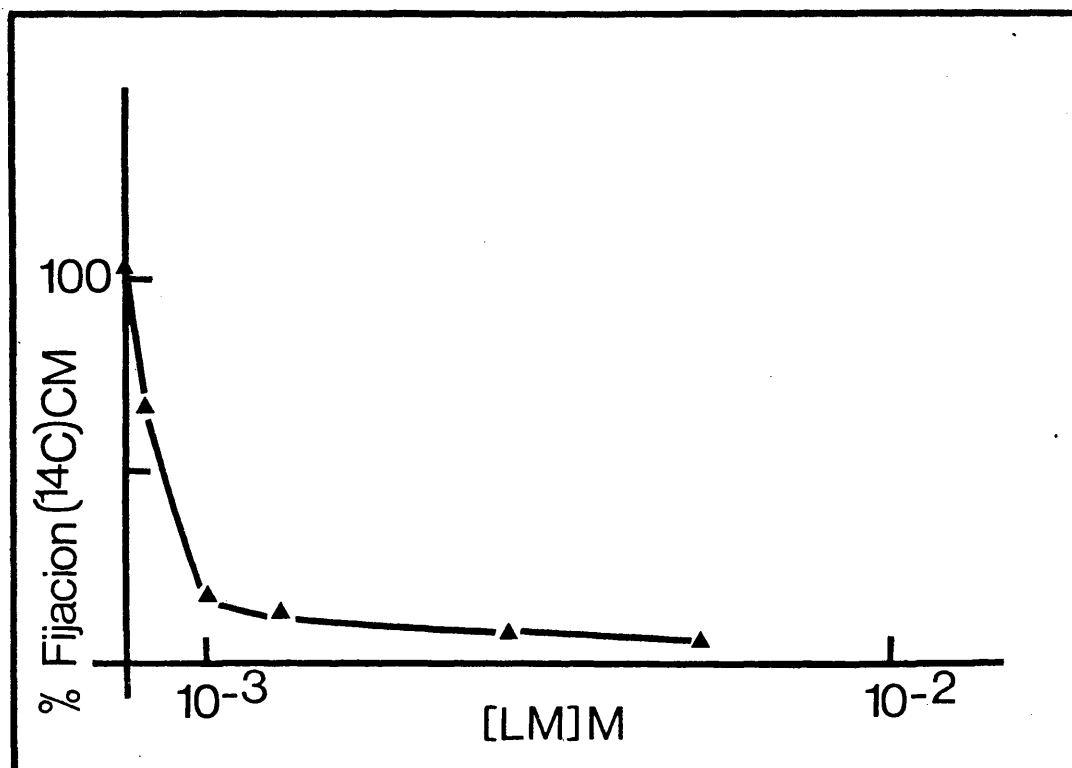
Nosotros ahora nos hemos propuesto el concretar si esta inhibición de fijación entre CM y lincomicina es de tipo competitivo, en el sentido en que no puede haber fijación simultánea de ambos antibióticos a una partícula ribosómica o sólo es parcial con el significado de que pueden fijarse simultáneamente a un ribosoma, pero con una afinidad reducida.

Primeramente, realizamos pruebas de inhibición de una concentración constante de CM por una serie de concentraciones crecientes de lincomicina en ausencia de etanol. La representación de los datos - así obtenidos aparece en la figura I-7 (a). En algunos lotes de ribosomas empleados la inhibición era total a concentraciones de LM de aproximadamente  $10^{-2}$  M; sin embargo en otros lotes de ribosomas, esta inhibición es sólo parcial quedando una parte de CM fijado no accesible al efecto de LM. Este hecho puede significar, o bien que lincomicina puede reducir la afinidad de CM por el ribosoma, o bien que hay una degradación, en algunos casos de una parte de los ribosomas

Fig. I-7. (a) Inhibición de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM por LM. Datos de un experimento de ultracentrifugación tomando solución después de centrifugar en condiciones standard descritas. El tiempo de incubación fue de 30 min. a  $0^{\circ}\text{C}$ . La concentración de ribosomas de 5 mg/ml y la concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) CM de  $10^{-6}$  M y la de ( $^{12}\text{C}$ ) LM se varió de  $2 \times 10^{-4}$  M a  $7,5 \times 10^{-3}$  M.

(b) Inhibición de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM por LM en presencia de etanol. Se hizo un experimento en condiciones standard, 33 % (v/v) de etanol. La concentración de ribosomas fue de 4,7 mg/ml, ( $^{14}\text{C}$ ) CM se puso a  $10^{-6}$  M y LM desde  $10^{-6}$  M a  $10^{-4}$  M.





para fijar lincomicina mientras mantienen íntegra su capacidad para fijar CM.

Dada la dificultad de determinar directamente el número de sitios de fijación en ausencia de etanol para lincomicina por su poca afinidad a los ribosomas de *E. Coli*, hemos recurrido a pruebas indirectas para discernir entre ambas posibilidades. El hecho de que en algún lote de ribosomas la inhibición de fijación de CM por LM sea total, como ocurre con etanol en los casos probados, figura I-7 (b) nos sugiere la segunda explicación, es decir, mayor labilidad de la capacidad del ribosoma para fijar LM que para fijar CM, y que ambos antibióticos se excluyan en la fijación. Esto mismo sugiere la fijación de lincomicina inhibida parcialmente por CM en los experimentos realizados, cap. II.

#### Interacción de eritromicina con la fijación de cloranfenicol.

Eritromicina es un inhibidor de biosíntesis de proteínas que actúa en subunidad 50S del ribosoma (Taubman, Jones, Joung y Corcoran 1966). Ya ha sido comunicado que eritromicina inhibe fijación de CM a ribosomas (Vázquez, 1966a). Sin embargo no se ha encontrado acción apreciable de CM sobre fijación de eritromicina a ribosomas de *B. Subtilis* con las concentraciones ensayadas (Oleicnick y Corcoran 1969), mientras que nosotros hemos encontrado una inhibición parcial de esta



Tabla I - 2

PRUEBA DE REVERSIBILIDAD INDIRECTA DE FIJACION  
DE ERITROMICINA

<u>Preincubación y diálisis</u>	<u>Incubación</u>	<u>cpm (<math>^{14}\text{C}</math>)CM fijado por mg 70S</u>
sin ER 33% EtOH	O EtOH	860
" " " "	33% EtOH	1500
$3 \times 10^{-6}$ M ER. 33% EtOH	O EtOH	840
" " " "	33% EtOH	170

Muestras de 0.2 ml conteniendo 6 mg por ml de 70S de E.coli en condiciones salinas standard y etanol a las concentraciones indicadas se preincubaron 60 min. y después se sedimentaron lavando nuevamente el sedimento con el mismo tampón. Los ribosomas se dializaron durante 14 horas a  $0^{\circ}\text{C}$  frente a un exceso del mismo tampón empleado anteriormente con objeto de eliminar la ER. A continuación se dializaron durante 8 horas frente a los mismos tampones conteniendo  $2 \times 10^{-6}$  M de ( $^{14}\text{C}$ )CM.

fijación por CM, cap. IV.

Por otro lado aunque eritromicina no inhibe formación de enlace peptídico entre Acetil fenilalanil-tRNA y puromicina (Cerná, Rychlik y Pulkrabek 1969) a diferencia de CM que sí inhibe (Gottesman, 1967) eritromicina revierte el efecto inhibidor de CM en esta reacción - (Teraoka 1970).

Similarmente aunque eritromicina no inhibe formación de enlace peptídico entre CACCA-Leu-Ac y puromicina revierte la inhibición de esta reacción por CM (Monro, Celma, Fernandez-Muñoz y Vázquez 1970).

Se ha postulado que los sitios de fijación en el ribosoma de - eritromicina y CM no coinciden por observaciones de que mutantes re sistentes a eritromicina conservan la misma susceptibilidad para CM (Olernick y Corcoran 1968). Nosotros hemos encontrado que eritromicina inhibe totalmente la fijación de CM, tanto en ausencia como en - presencia de etanol, fig. I-8. En presencia de etanol a la concentración empleada en nuestras condiciones de reacción de fragmento con - PM, la inhibición de la fijación de CM es irreversible, como se ve - en tabla I-2 en la que dializando ribosomas pretratados con eritromici na siguen sin poder fijar CM. Este hecho sugiere que eritromicina se comporta como irreversible en su fijación a los ribosomas en presencia de la concentración de etanol empleada. Si esto se cumpliera sería de esperar que si pretratamos ribosomas, a una concentración -

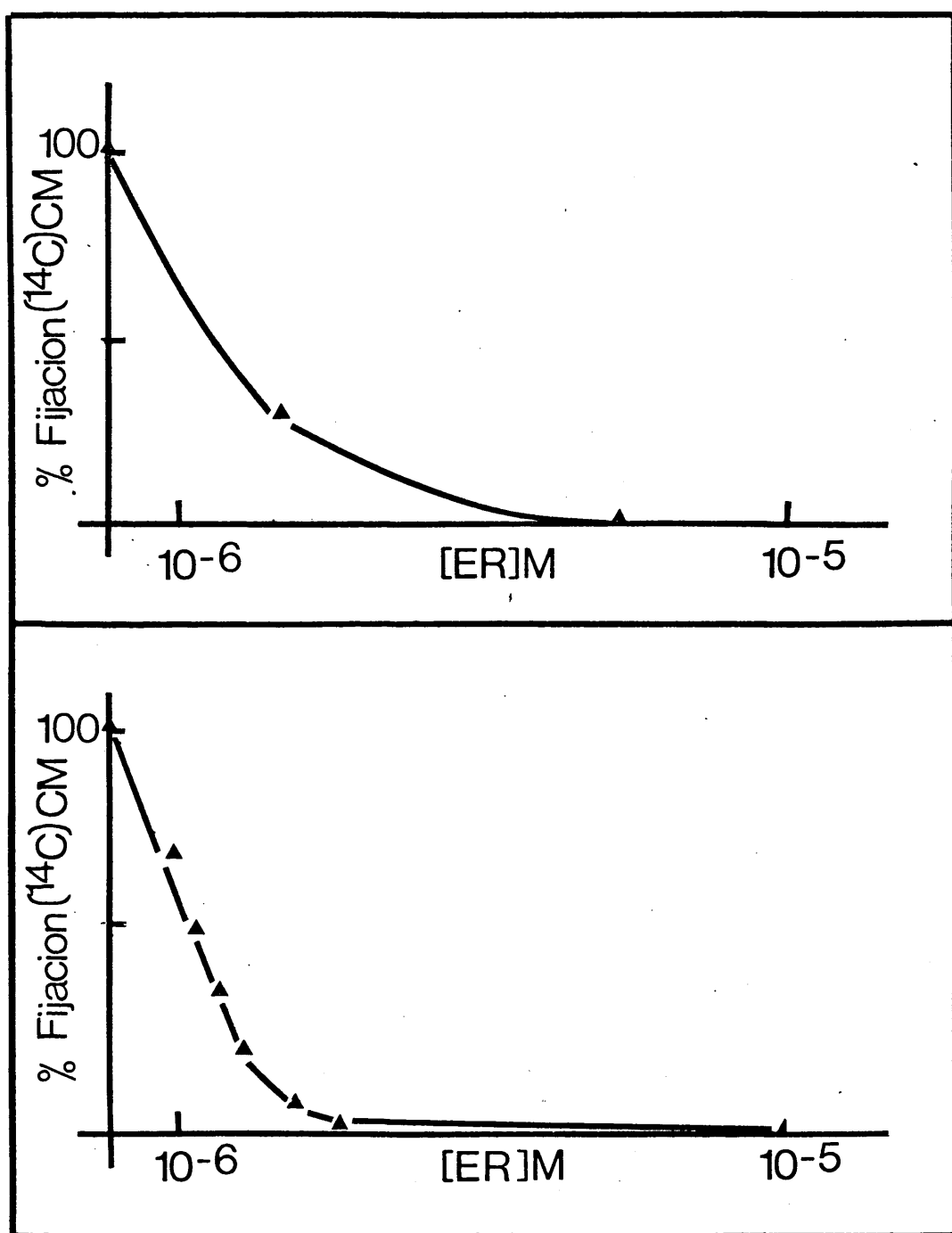


Figura 1-8. (a) Inhibición de fijación de  $(^{14}\text{C})\text{CM}$  por ER. Resultado de un ensayo de ultracentrifugación con medida de radioactividad en solución en condiciones standard. La concentración de ribosomas era de 6.5 mg por ml.  $(^{14}\text{C})\text{CM}$  a  $2.5 \times 10^{-6}\text{M}$  y ER de  $2.5 \times 10^{-6}$  a  $10^{-5}\text{M}$ .

(b) Inhibición de fijación de  $(^{14}\text{C})\text{CM}$  por ER en presencia de 33% de etanol. La concentración de ribosomas era de 5.5 mg por ml.,  $(^{14}\text{C})\text{CM}$  a  $10^{-6}\text{M}$  y ER se varió desde  $10^{-6}\text{M}$  a  $10^{-5}\text{M}$ .

constante, con eritromicina a concentraciones menores, que aquella, para cada una de éstas concentraciones los ribosomas se han de comportar para fijación de CM como si el número de sitios de fijación fuera menor y el resto lo fijara con la misma afinidad, como en efecto se ve que ocurre en la figura I-9.

El que eritromicina se comporte como irreversible, manifiesta - reversión muy lenta, en su fijación a ribosomas en presencia de etanol se comprobó cuando se dispuso de eritromicina marcada isotópicamente, ( cap. IV ).

Así pues dado que eritromicina inhibe totalmente fijación de CM y éste como veremos en nuestros experimentos, inhibe parcialmente fijación de eritromicina, y sabido que tanto eritromicina como CM tienen un sitio de fijación por ribosoma cap. IV, creemos que los sitios de fijación de ambos se superponen de modo que eritromicina excluye a CM, pero que ésta solamente debilita la fijación de eritromicina, probablemente debido a la fuerte fijación de su molécula, con varios puntos de dirección, según nuestros calculos a partir de constantes de afinidad la energía libre de fijación sería de ( 8 a 9 ) Kcal/mol lo que supone varios puntos de enlace con el ribosoma.

#### Efecto de puromicina en fijación de cloranfenicol.

Como se ha dicho es de importancia para situar la acción de un antibiótico con relación al enzima peptidiltrnasferasa del ribosoma

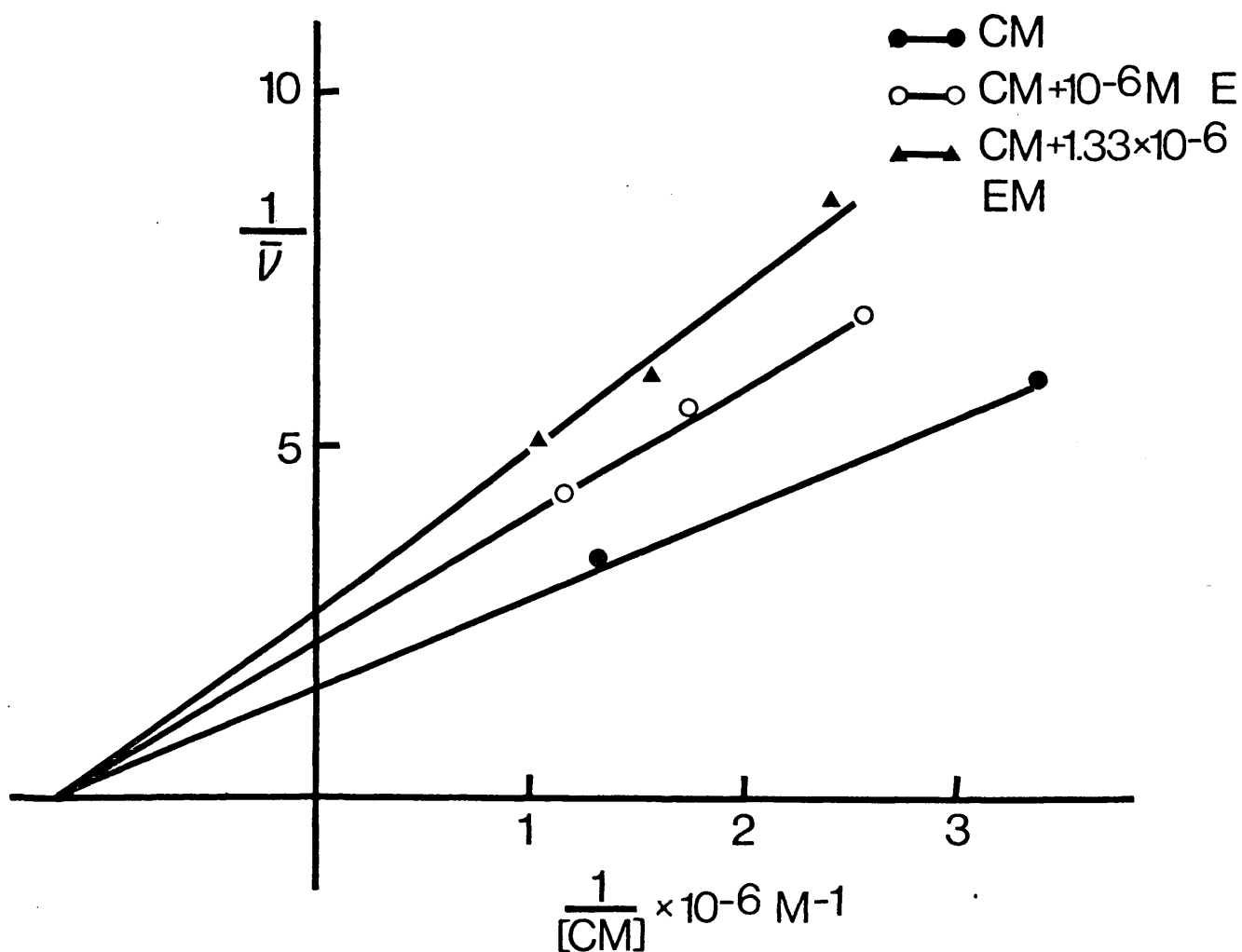


Fig. I-9. Ensayo de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM y de su inhibición por ER. hecho en presencia de etanol, por sedimentación. Una solución de 6 mg/ml en solución standard con 33 % (v/v) de etanol, se preincubó 60 min. a  $0^\circ\text{C}$  con las concentraciones de ER indicadas. A continuación se pasó a tubos conteniendo ( $^{14}\text{C}$ ) CM desecado para dar concentraciones de  $5 \times 10^{-7}$  M a  $5 \times 10^{-6}$  M incubándose otros 60 min. en estas condiciones. Se tomaron las muestras de modo usual y se representaron los datos según isoterma de Klotz.

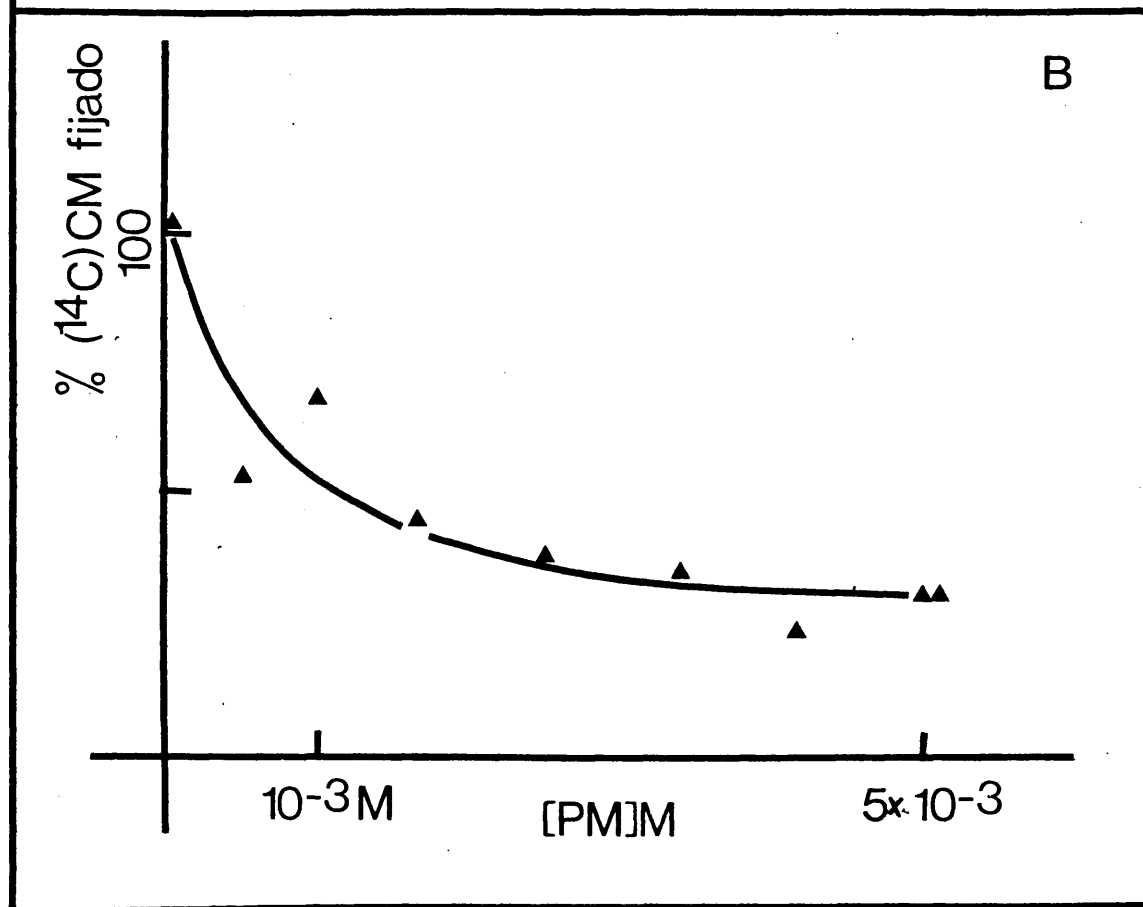
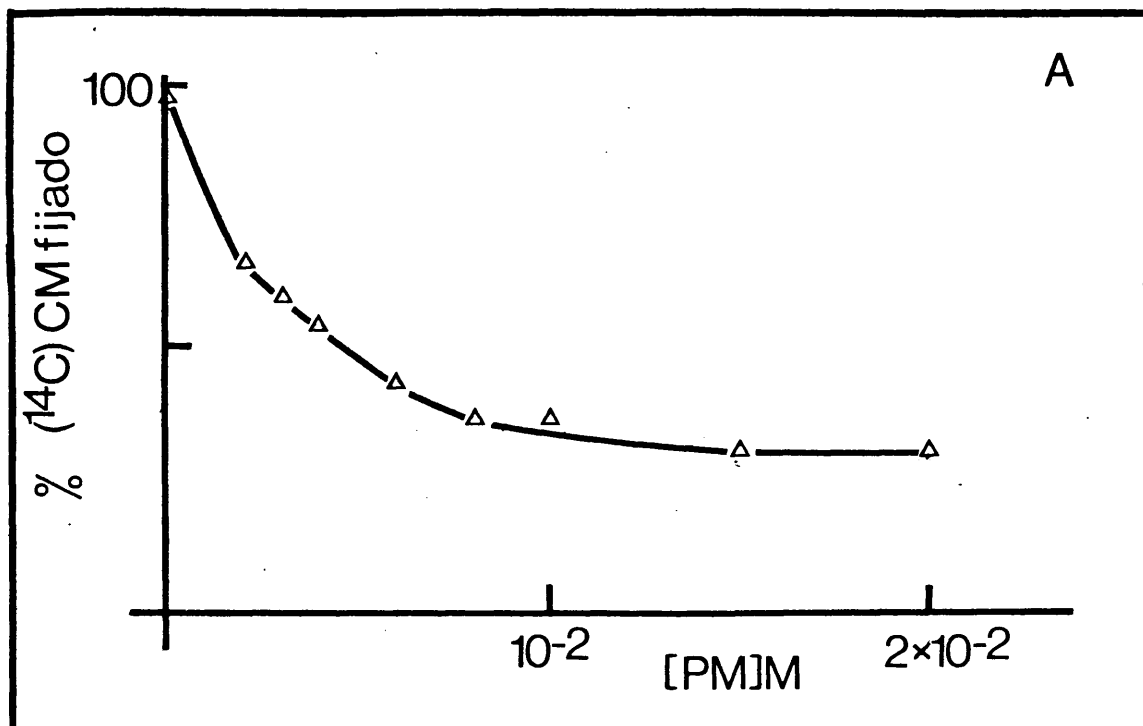
al conocer su posición respecto a puromicina, el más simple sustrato aceptor conocido.

De la interrelación entre ambos antibióticos no existen más que algunas pruebas de cinética de la reacción de polilisil-tRNA y de N-Acetil aminoacil tRNA con puromicina. Así para Goldberg en el primer sistema CM es inhibidor de tipo mixto con respecto a puromicina (Goldberg 1967) mientras que para Pestka con el segundo es competitivo puro para dicho sustrato (Pestka 1970). Nosotros estudiaremos estas interacciones en el sistema más simplificado, libre de posibles interacciones perturbadoras usando el sustrato de la reacción del - fragmento. ( cap. III ).

En primer lugar estudiamos el efecto de puromicina sobre fijación de CM, tanto en presencia como en ausencia de etanol, figura - I-10. Se observa que para producir inhibición en la fijación de CM - es necesario alta concentración de puromicina, de acuerdo con su alta constante de disociación estimada a partir de su fijación directa, y de las medidas de cinética de su reacción con CACCA-Leu-Ac.

Esta inhibición parcial puede significar bien, competición parcial en su fijación al ribosoma, de ambas moléculas, que se fijarían simultáneamente con menor afinidad por el mismo número de sitios para ambos, bien que los dos antibióticos se excluyan mutuamente de los ribosomas, de modo que no puede haber fijación simultánea, pero

Fig. I-10. Efecto de PM en fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM. A.- En presencia de etanol a 33 % (v/v). Experimento de sedimentación en condiciones standard. B.- en ausencia de etanol, experimento de ultracentrifugación, midiendo radioactividad en solución. En ambos casos la concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) CM fue de  $10^{-6}$  M y la de ribosomas de 10 mg/ml.





que haya un número de ribosomas capaces de fijar CM pero no puromicina por degradación selectiva, también cabe la posibilidad de competencia parcial por distinto número de sitios.

A la vista de nuestros resultados creemos que existe una competición parcial por el mismo número de sitios para fijación de puromicina y CM ya que:

I.- De experimentos de inhibición de fijación de ( $^3\text{H}$ ) puromicina por CM hay cierta evidencia de competición parcial recíproca.

2.- Si existiera un número de ribosomas capaces de fijar CM, pero no puromicina, a concentraciones saturantes de ésta en inhibición de fijación de CM, estos ribosomas mostrarían para las concentraciones de CM ensayadas, para bajos valores de  $\bar{v}$ , una constante de disociación similar a la de los ribosomas sin puromicina, es decir, la misma pendiente en la representación de Scatchard. Sin embargo como se observa en la figura I-II, los gráficos de Scatchard para CM en sus puntos correspondientes a concentraciones del mismo, en los que puromicina es saturante, no muestran pendiente igual a la del control. Por el contrario muestran una pendiente homegénea correspondiente a la constante de disociación de CM para unos ribosomas modificadas homogeneamente por la fijación de puromicina.

Esta constante de asociación modificada  $K_{CM}^I$  para CM a ribosomas saturados de puromicina la podemos calcular a partir de la expresión

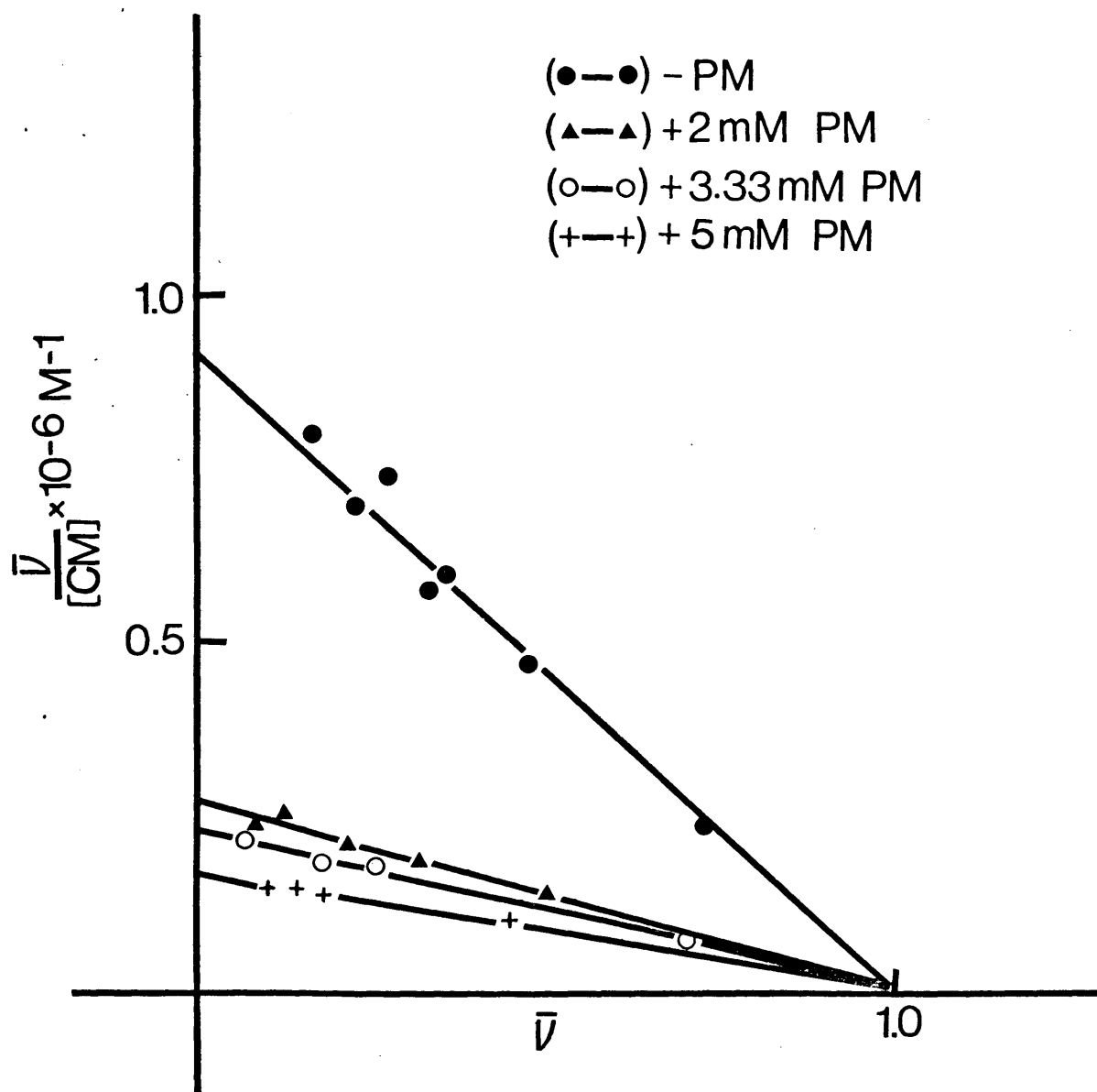


Fig. I-II. Representaciones de Scatchard para ( $^{14}C$ ) CM en fijación a 70S de E. Coli en ausencia y presencia de concentraciones saturantes de PM. Las condiciones son las mismas que las del experimento de la figura I-5, excepto en que se añadía PM a las concentraciones indicadas.

basada en nuestra conclusión.

$$\Delta \bar{V}_{CM} = (\bar{V}_{CM})_{(PM)} = 0 - (\bar{V}_{CM})_{(PM) \rightarrow \infty} = \frac{K_{CM} (CM)}{1 + K_{CM} (CM)} - \frac{K'_{CM} (CM)}{1 + K'_{CM} (CM)}$$

siendo (PM) concentración de puromicina libre en equilibrio

(R) concentración de ribosomas libres en equilibrio

(CM) concentración de CM libre en equilibrio.

(R-CM), (R-PM) (CM-R-PM) concentraciones de los complejos correspondientes en el equilibrio, aplicado por ejemplo a los puntos - del experimento I-10 suponiendo  $K_{CM} 0^{\circ}C = 5 \times 10^5 M^{-1}$ .

$$\Delta \bar{V} = 0.240 - 0.035 = 0.215$$

$$\text{de } 0.215 = \frac{5 \times 10^5 M^{-1} (1.04 \times 10^{-6} M)}{1 + 5 \times 10^5 M^{-1} (1.04 \times 10^{-6} M)} - \frac{K'_{CM} (0.630 \times 10^{-6} M)}{1 + K'_{CM} (0.630 \times 10^{-6} M)}$$

obtenemos  $K'_{CM} = 2 \times 10^5 M^{-1}$ .

Así la constante de asociación de CM se ha reducido a  $\frac{2}{5}$  de la - inicial para ribosomas con PM fijada.

3.- CM en nuestros experimentos de cinética de reacción de CACCA Leu-Ac con puromicina resulta ser un inhibidor de tipo mixto como ve remos en el cap. III, lo cual exige una competición parcial entre CM y puromicina. El efecto de algunos inhibidores de biosíntesis de pro teinas sobre fijación de CM aparece en tabla I-2.

Parece ser que estreptogramina A se fija a ribosomas en un sitio distinto a estreptogramina B y análogas (Ennis, 1971). Esta distinta

localización viene reflejada por el distinto efecto inhibidor de ambos grupos de estreptogramina en fijación de CM.

TABLA I-2

EFFECTO DE UNA SERIE DE INHIBIDORES DE BIOSINTESIS DE PROTEINAS EN FIJACION DE ( $^{14}\text{C}$ ) CLORAMFENICOL A RIBOSOMAS DE E.COLI

<u>Antibiótico</u>	<u>Conc. (M)</u>	<u>% Inhibición de fijación de (<math>^{14}\text{C}</math>) CM</u>
Estreptogramina A	$10^{-4}$	100
Estreptogramina B	$10^{-4}$	63
Viridogriseina	$10^{-4}$	42
Amicetina	$10^{-4}$	0
Esparsomicina	$5 \times 10^{-4}$	18
Esparsomicina	$10^{-3}$	17
Gougerotina	$10^{-4}$	10
Gougerotina	$10^{-3}$	14
Celesticetina	$10^{-4}$	57
Botromicina	$10^{-4}$	16
Berninamicina	50 mg/ml	0
Siomicina	$10^{-4}$	0
Tioestrepton	$10^{-4}$	0

<u>Macrólidos</u>	<u>Conc. (M)</u>	<u>% Inhibición de fijación de (<math>^{14}\text{C}</math>) CM</u>
Eritromicina	$10^{-4}$	100
Espiramicina III	$10^{-4}$	95
Neoespiramicina III	$10^{-4}$	100
Forocidina III	$10^{-4}$	72
Carbomicina	$10^{-4}$	84
Oleandomicina	$10^{-4}$	100
Angolamicina	$10^{-4}$	37
Lancamicina	$10^{-4}$	95
Metimicina	$10^{-4}$	85
Chalcomicina	$10^{-4}$	75

---

Ensayo de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM con etanol. Condiciones usuales (ver métodos). Concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) CM de  $10^{-6}$  M, concentración de ribosomas de 5 mg/ml. Los antibióticos se enfrentaron simultáneamente a los ribosomas.

Amicetina, gougerotina y esparsomicina, inhibidores de formación de enlace peptídico (Monro, Vazquez 1967) y estimulantes de fijación de CACCA-Leu-Ac (Monro, Celma y Vazquez 1969), parecen tener sitios de fijación distintos al de fijación a las de CM, lincomicina y eritromicina según se observa en tabla y en capítulos II y IV.

En el caso de esparsomicina hay una pequeña pero significativa

inhibición de fijación de CM, lo cual sugiere una competición parcial que explicaría el efecto bloqueante de CM de la acción estimulante - de fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas por esparsomicina.

Celesticetina, análoga de lincomicina, pero con menor afinidad por ribosomas de E. Coli, capítulo II, tiene menor efecto que aquella en la inhibición de CM.

Botromicina y berninamicina no inhiben fijación de CM.

Siomicina y tioestrepton, inhibidores de fijación del factor G de translocación a ribosomas no afectan tampoco la unión de CM al ri bosoma lo que indica junto con los resultados análogos para lincomicina y eritromicina cierta separación entre ambos centros enzimáticos

Se han ensayado una amplia gama de antibióticos del grupo de - macrólidos que se muestran buenos inhibidores de fijación de CM en - presencia de etanol, este resultado que generaliza los obtenidos en ausencia de etanol por Vazquez (1966a)

#### Fijación de <sup>14</sup>C cloramfenicol a ribosomas de Bacillus Subtilis.

Hemos realizado estas experiencias en B. Subtilis con objeto de generalizar este estudio cuantitativo, con una bacteria Gram positiva y a la vez correlacionar las fijaciones medidas en nuestros sistemas, con las actividades in vivo del antibiótico.

En la figura I-I2 hemos representado una isoterma según represent

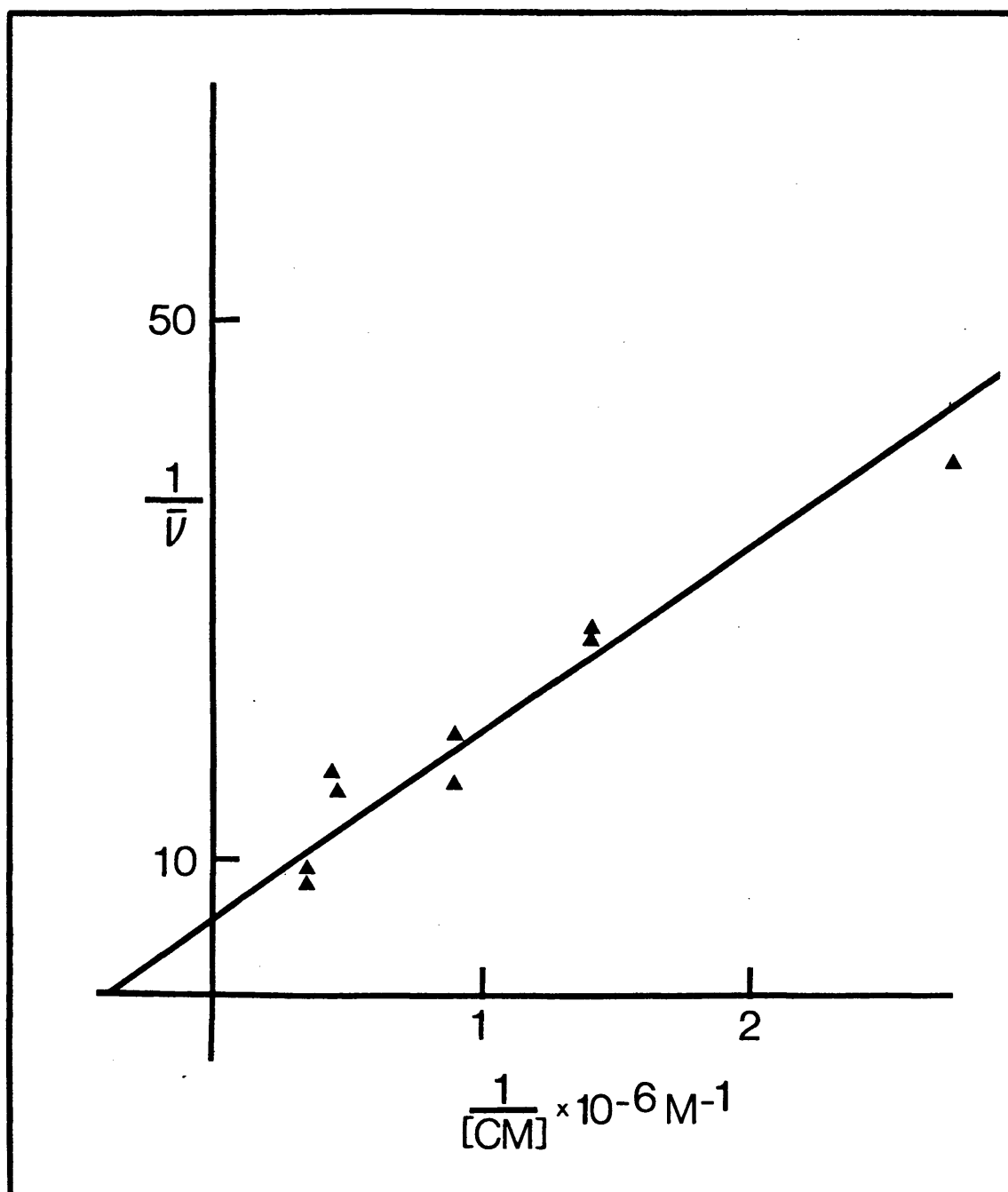


Fig. I-12. Representación de Klotz, para fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM a ribosomas 70S de B. Subtilis por el método de diálisis. Se dializaron durante 20 horas a  $0^\circ\text{C}$  con ligera agitación, soluciones de 7 mg/ml de ribosomas en solución standard frente a la misma conteniendo ( $^{14}\text{C}$ ) CM en concentraciones comprendidas entre  $3 \times 10^{-7} \text{ M}$  y  $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

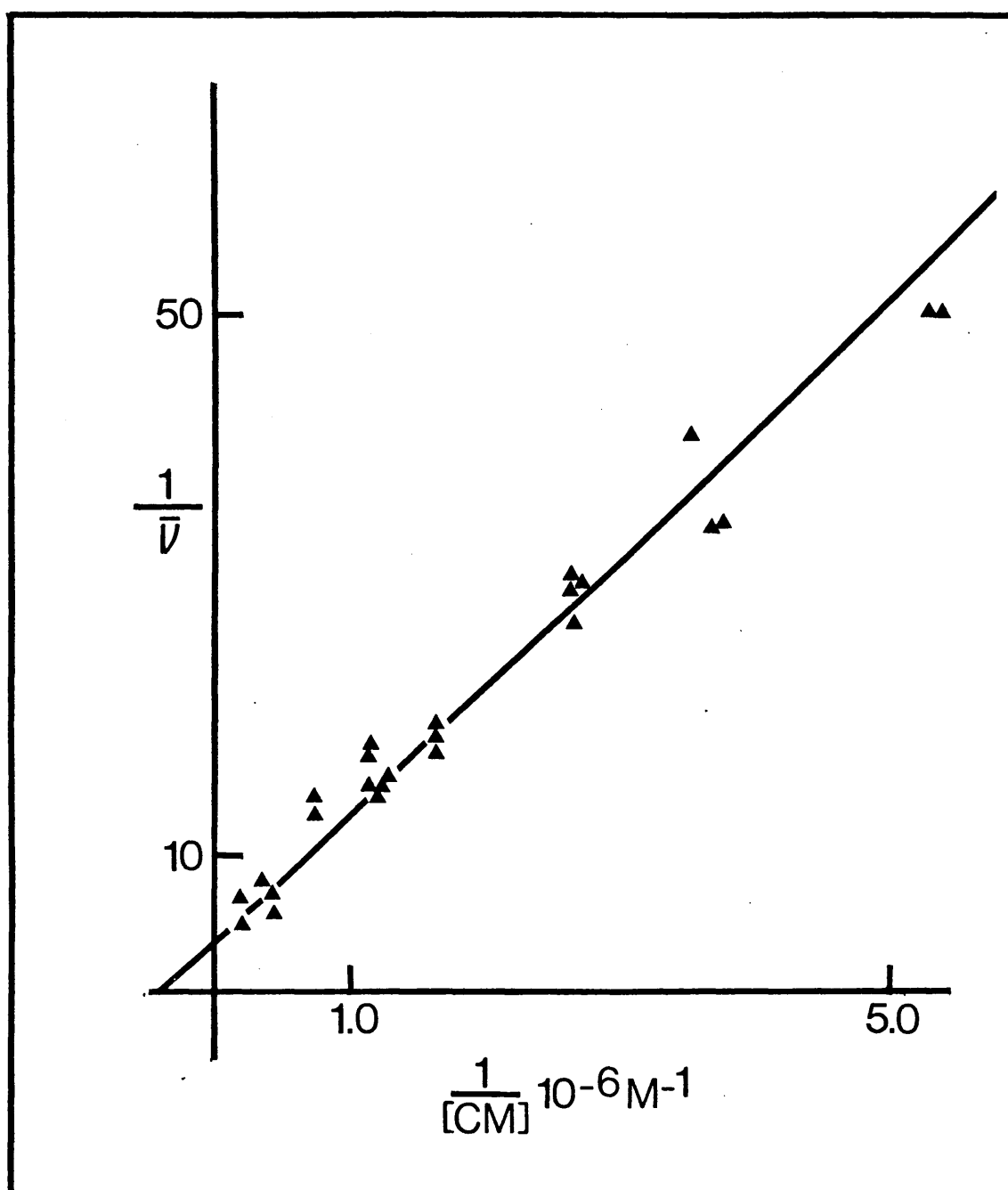


Fig. I-I3. Representación de Klotz para fijación de ( $^{14}C$ ) CM a ribosomas de B. Subtilis en presencia de 33 % (v/v) de etanol, según un experimento standard de sedimentación. La concentración de ribosomas fue de 10 mg/ml y la concentración de ( $^{14}C$ ) CM estaba comprendida entre  $2 \times 10^{-7} M$  y  $2 \times 10^{-6} M$ .



tación recíproca de Klotz con datos de un experimento de diálisis. - El número de sitios de fijación es de 0,2 por ribosoma, que originalmente debió ser mayor dada la habilidad de estos ribosomas (Takeda y Lipman 1966 ).

Se observa una afinidad homogénea de constante de disociación -  $K_d 0^{\circ} = 2,7 \times 10^{-6} M$ , empleando ribosomas del mismo lote en experimentos de fijación con presencia de etanol en la reacción, la gráfica - recíproca se representa en fig. I-I3.

Se observa un número de sitios de fijación análogos al del experimento sin etanol, 0,35 por ribosoma, lo cual nos confirma la conservación de este parámetro por el etanol. En cuanto a la constante de disociación es de  $K_d 0^{\circ} = 4 \times 10^{-6} M$ , algo mayor que presenta en ausencia de etanol, efecto similar al que se observa en E. Coli. Así - mismo la constante de disociación es tanto con como sin etanol similar a la de E. Coli como corresponde a la análoga actividad de CM en estas bacterias in vivo.

#### Fijación de $^{14}C$ cloramfenicol a ribosomas de Anacystis Montana

Hemos realizado la fijación de algunos antibióticos en este microorganismo como representante del grupo de algas azules.

En el caso de CM en las figuras I-I4 y I-I5 pueden verse representaciones de isotermas de fijación, de tipo recíproco, de experi-

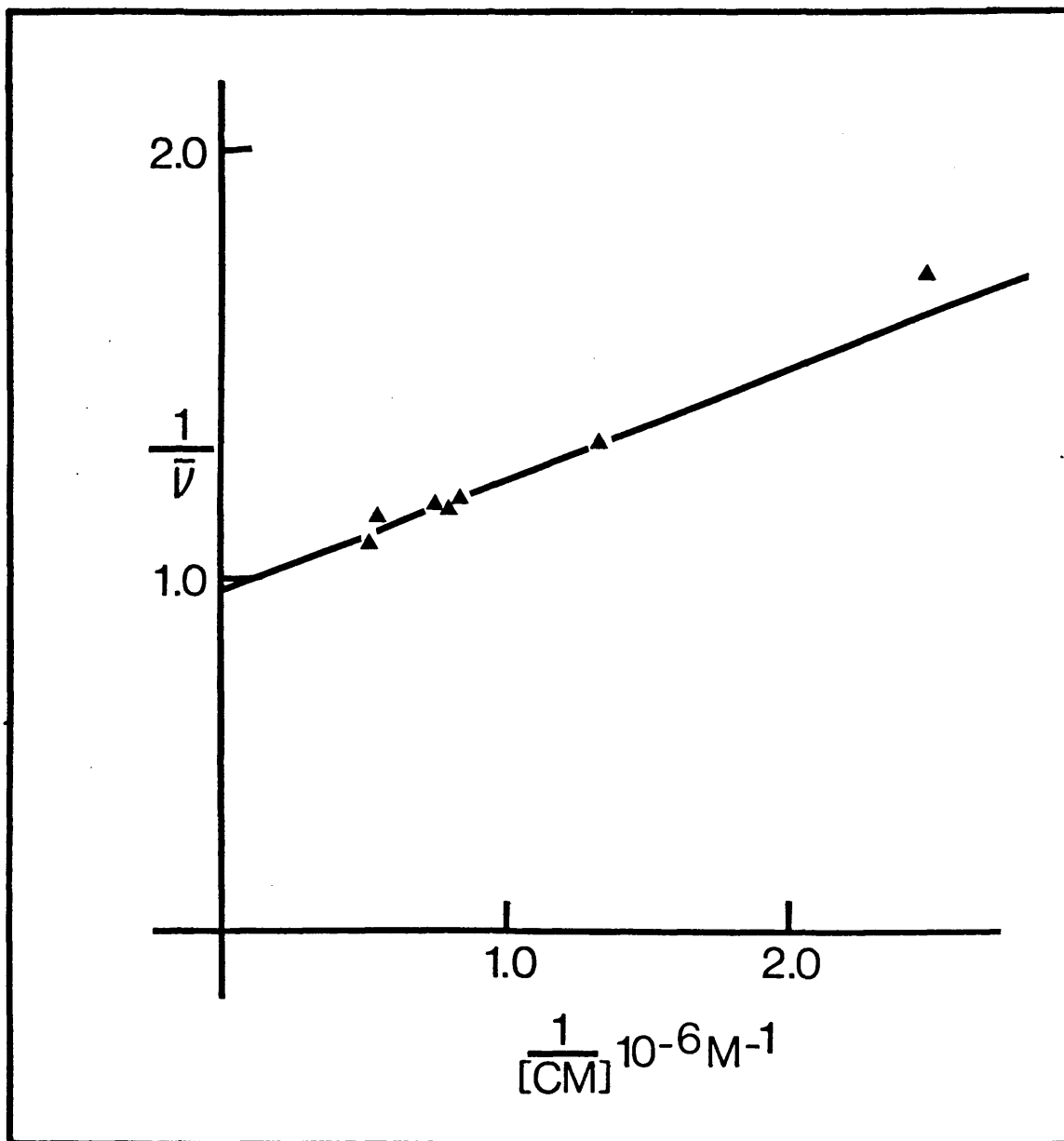


Fig. I-I4. Representación de Klotz de fijación de ( $^{14}C$ ) CM a ri bosomas de A. Montana de un experimento de diálisis en cámaras. La - concentración de ribosomas en la solución standard era de 4 mg/ml y la concentración de ( $^{14}C$ ) CM estaba comprendida entre  $4 \times 10^{-7}$  M y -  $2 \times 10^{-6}$  M. El tiempo de incubación, con ligera agitación, fué de 12 horas a  $0^{\circ}C$ .

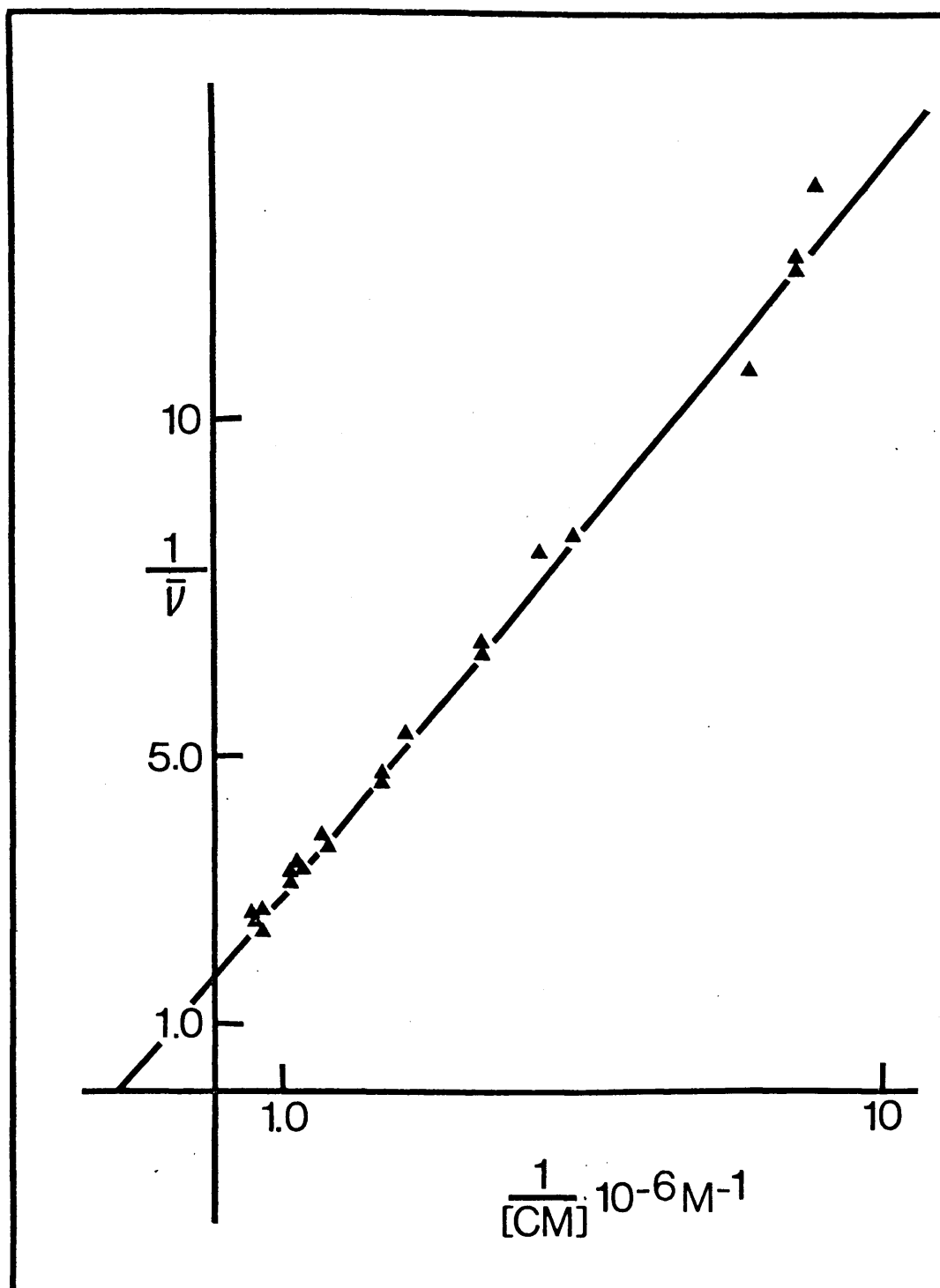


Fig. I-I5. Representación de Klotz para fijación de ( $^{14}C$ ) CM a ribosomas de A. Montana, en presencia de 33 % (v/v) de etanol según experimento standard de sedimentación. La concentración de ribosomas fué de 3,5 mg/ml y ( $^{14}C$ ) CM varió desde  $2.5 \times 10^{-7} M$  a  $10^{-5} M$ .

mentos de diálisis y de etanol respectivamente.

En el caso de diálisis al número de sitios de fijación es de 1 y la  $K_d$   $0^{\circ}\text{C} = 4,0 \times 10^{-7}$  M, mientras que en el experimento de etanol el número de sitios es de 0,7 y la  $K_d$   $0^{\circ}\text{C} = 6,5 \times 10^{-7}$  M.

Esta diferencia en el número de sitios de fijación puede explicarse por la dificultad de obtener estos ribosomas con igual grado de pureza lo cual hemos observado, tiene una influencia en el número de sitios de fijación.

En conjunto como se ha visto, etanol disminuye ligeramente la afinidad por CM de ribosomas de diversos microorganismos, conservando el número de sitios de fijación. Esto indica, dada la distinta constitución de los ribosomas de diferentes organismos, un efecto específico de etanol sobre ciertas regiones de los distintos ribosomas, que en el caso de fijación de CM se traduce en inhibición, mientras en la lincomicina y eritromicina en estimulación de la misma.

## Capítulo II

### FIJACION DE LINCOMICINA A RIBOSOMAS DE ESCHERICHIA COLI B. SUBTILIS Y ANACYSTIS MONTANA.

Al ser lincomicina antibiótico poco activo en bacterias Gram negativas, si realmente el efecto primordial es inhibir la síntesis de proteínas en la fase que tiene lugar en el ribosoma por una acción directa en el mismo, sería de esperar una fijación de escasa afinidad en E. Coli. Así Chang y Weisblum(1967), no le encuentran en absoluto con la técnica de filtración de Nirenberg y Leder(1964).

Nosotros que habíamos elegido E. Coli para nuestro trabajo de fijación, también nos encontramos con la dificultad de obtener una fijación de lincomicina cuantificable siguiendo aquel método. Así en un experimento similar al de los autores citados con  $^{14}\text{C}$  LM, no se encontró fijación apreciable. (Tabla II-I).

El primer paso que procedía era el caracterizar cuantitativamente esta fijación, es decir encontrar cual era el número de sitios de fijación por ribosoma, conocer los tipos de fijación que existieran y caracterizarlos por sus constantes de disociación. Ya Chang y Weisblum (1967) sugirieron que se fija una molécula de LM por ribosoma de B. stearothermophilus aunque no comprobaron la homogeneidad de esta fijación.

TABLA II-I

FIJACION DE  $^{14}\text{C}$  LM A RIBOSOMAS DE *E. COLI* Y *ANACYSTIS MONTANA*

<u>Ribosomas de</u>	<u>CPM <math>^{14}\text{C}</math> lincomicina fijada</u>
A. Montana	707
E. Coli	6

Se incubaron muestras de 0,05 ml de solución salina standard con teniendo 3 mg/ml de ribosomas y  $^{14}\text{C}$  LM a  $5 \times 10^{-6}$  M, 30 min. a 0°C. Para medir la radioactividad inespecíficamente absorbida por los filtros en tubos controles, se añadió ( $^{14}\text{C}$ ) LM a  $8 \times 10^{-4}$  M. Se filtraron por discos de nitrato de celulosa según se explicó en métodos. - Estos se pegaron en planchetas de aluminio y se midió radioactividad en contador de gas, Nuclear Chicago.

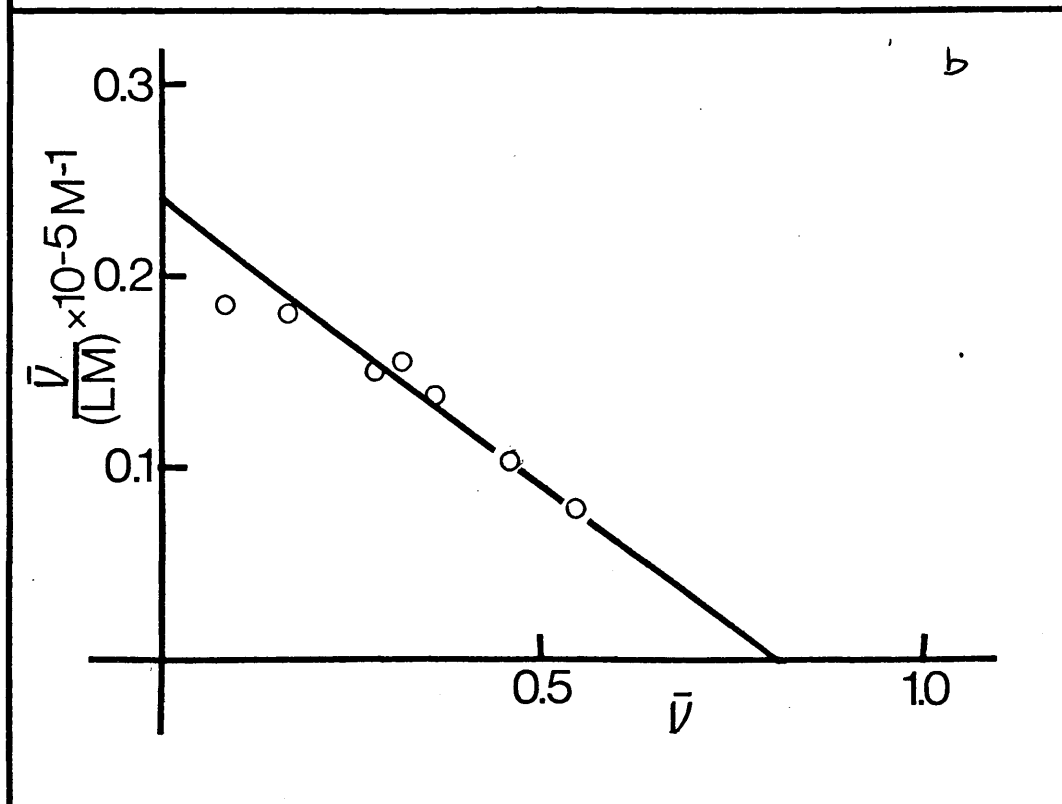
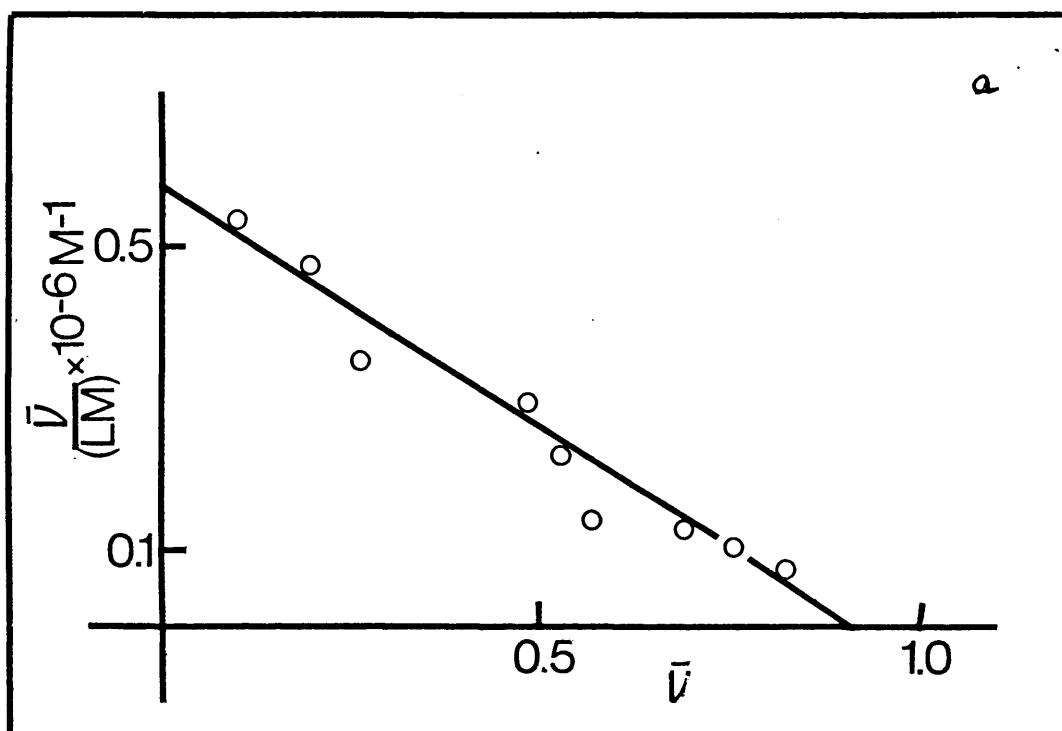
Simultáneamente que en E. Coli se hicieron estas medidas en una bacteria Gram positiva (*B. Subtilis*) y un alga azul (*A. Montana*), - con objeto de tener otro punto de comparación entre nuestros resultados en los distintos microorganismos y los efectos in vivo.

Así pues nos encontramos en primer lugar, que necesitábamos un método sensible para poder detectar la fijación de LM.

Esto se consiguió por el método de diálisis utilizando muy altas concentraciones de LM caracterizándose así una fijación de lincomicina  $K_d$  0°C =  $3,5 \pm 1,0 \times 10^{-6}$  M, con un número de sitios aproximado de una molécula por ribosoma, según se aprecia en la figura II-I.(b)

Fig. II-I (a) Representación de Scatchard para fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas de E. Coli en presencia de 33 % (v/v) de etanol. Sedimentación como se indicó en métodos. Tiempo de incubación de 30 min. a 0°C. Se empleó una concentración de ribosomas de 4,4 mg/ml para - una concentración de antibiótico ( $^{14}\text{C}$ ) Lm de  $2 \times 10^{-7}$  M a  $4 \times 10^{-6}$  M y de 8,8 mg/ml cuando esta se empleó de  $6 \times 10^{-6}$  M a  $10^{-5}$  M.

(b) Representación de Scatchard para fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas de E. Coli por el método de diálisis en cámaras. Solución standard con una concentración de ribosomas de 25 mg/ml, se dializaron en presencia de ( $^{14}\text{C}$ ) LM en concentraciones comprendidas entre  $4 \times 10^{-6}$  M y  $3,4 \times 10^{-5}$  M





Con objeto de comparar estos resultados con los obtenidos inhibiendo la reacción del fragmento con lincomicina, se estudió la fijación de este antibiótico en el mismo medio usado para dicha reacción.

Como puede verse en la figura II-2, en las concentraciones de lincomicina empleadas hay un considerable aumento en la fijación del antibiótico en presencia de etanol. Se observó por tanto en este caso un efecto opuesto al producido en la fijación del cloranfenicol.

Como primera prueba de identificación de esta fijación se ensayó su reversibilidad mediante un ensayo de dilución isotópica, y como puede verse en tabla II-2, la lincomicina marcada fijada puede ser desplazada totalmente por la no radioactiva añadida posteriormente, prueba clara de reversibilidad en aquella fijación.

A continuación procedimos a caracterizar el número de sitios, así como las constantes de disociación de aquellos. Como puede observarse en la figura II-1a) en una de las representaciones de Scatchard obtenidas,  $M^*$  se fija homogéneamente a los ribosomas en la proporción uno a uno, con una constante de afinidad de  $K_d \text{ } 0^\circ\text{C} = 1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

Experimentos realizados con ribosomas de A. Montana muestran que en ellos también lincomicina se fija en la proporción uno a uno tanto con como sin etanol, es decir el alcohol no cambia el número de sitios de fijación para el antibiótico, aunque como se aprecia en las

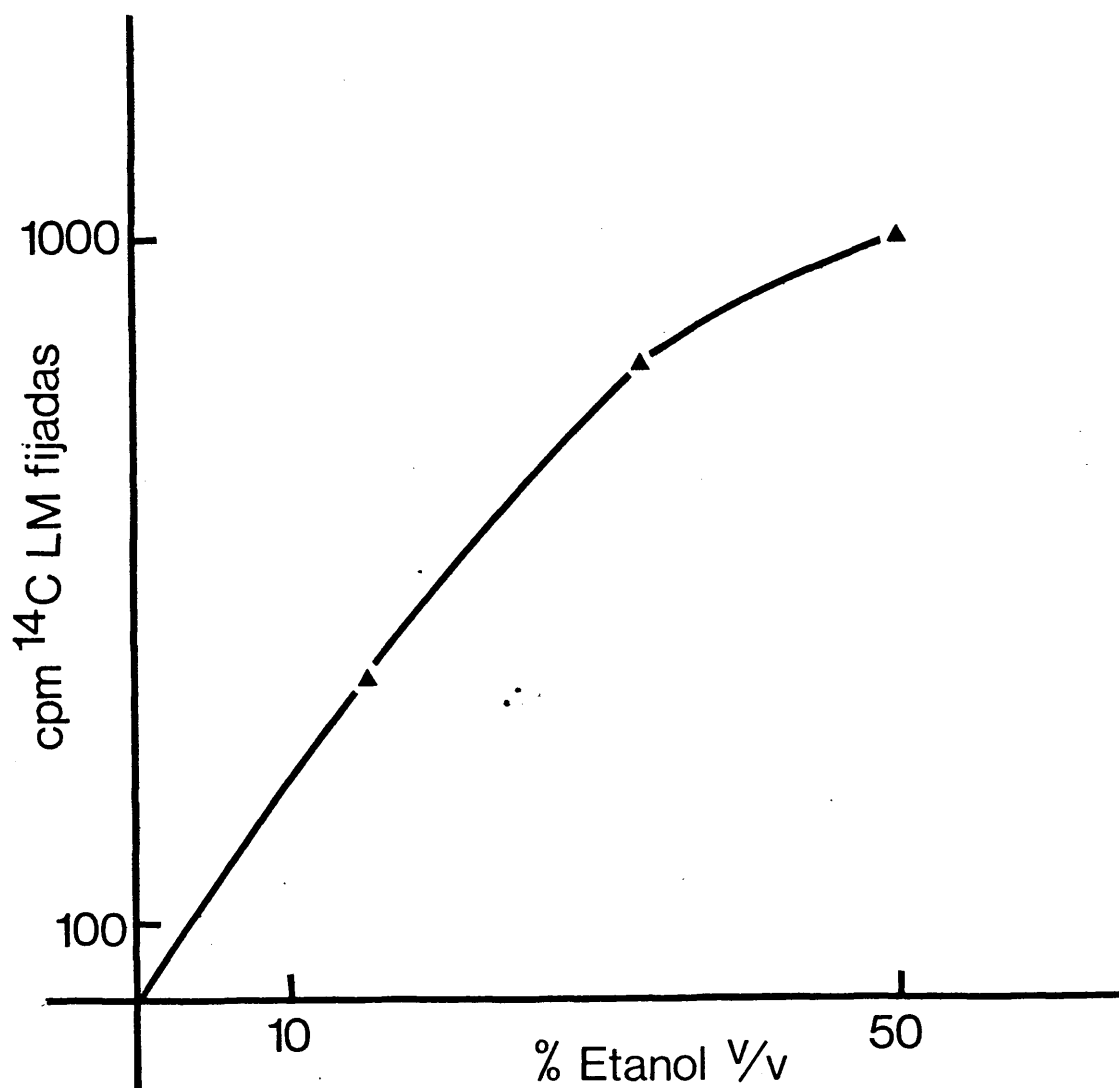


Fig. II-2. Efecto de etanol en la fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) CM a ribosomas de E. Coli. Ensayo de ultracentrifugación de una solución standard conteniendo 5 mg/ml de ribosomas y  $2.5 \times 10^{-6}$  M de ( $^{14}\text{C}$ ) LM. Tras 60 minutos de incubación a  $0^\circ\text{C}$ , se centrifugaron muestras de 0.3 ml 2 horas a 150.000 g. tomándose 0.2 ml de solución.

figuras II-3 y II-4 la constante de disociación en presencia de etanol ( $K_d$  0°C =  $5 \times 10^{-8}$  M) es diez veces menor que sin él, ( $5 \times 10^{-7}$  M) determinada en experimentos de equilibrio de diálisis.

TABLA III-2

REVERSIBILIDAD DE FIJACION DE LINCOMICINA A RIBOSOMAS DE E. COLI EN  
33 % ETANOL

Incubación			<u>cpm fijadas</u>
<u>0 min a 30 min</u>	<u>30 min a 60 min</u>		
( $^{14}$ C) LM	( $^{14}$ C) LM		220
—	( $^{14}$ C) LM		215
( $^{14}$ C) LM	( $^{14}$ C) LM ( $^{12}$ C) LM		0

Datos de un ensayo de centrifugación con etanol. Los ribosomas a 6 mg/ml se enfrentaron con  $^{14}$ C LM a una concentración de  $10^{-6}$  M a  $^{12}$ C LM a  $2,5 \times 10^{-3}$  M en los tiempos indicados. Se tomaron muestras después de centrifugar, de 0,1 ml.

En cuanto a E. Subtilis pudo determinarse el número de sitios y la constante de disociación en presencia de etanol (fig. II-5). Sin embargo debido a la labilidad de sus ribosomas en nuestras condiciones iónicas el número de sitios es de aproximadamente 0,5 moléculas por partícula ribosómica con afinidad homogénea dada por  $K_d = 3,33 \times 10^{-8}$  M. Así pues lincomicina se fija más fuertemente a ribosomas en presencia

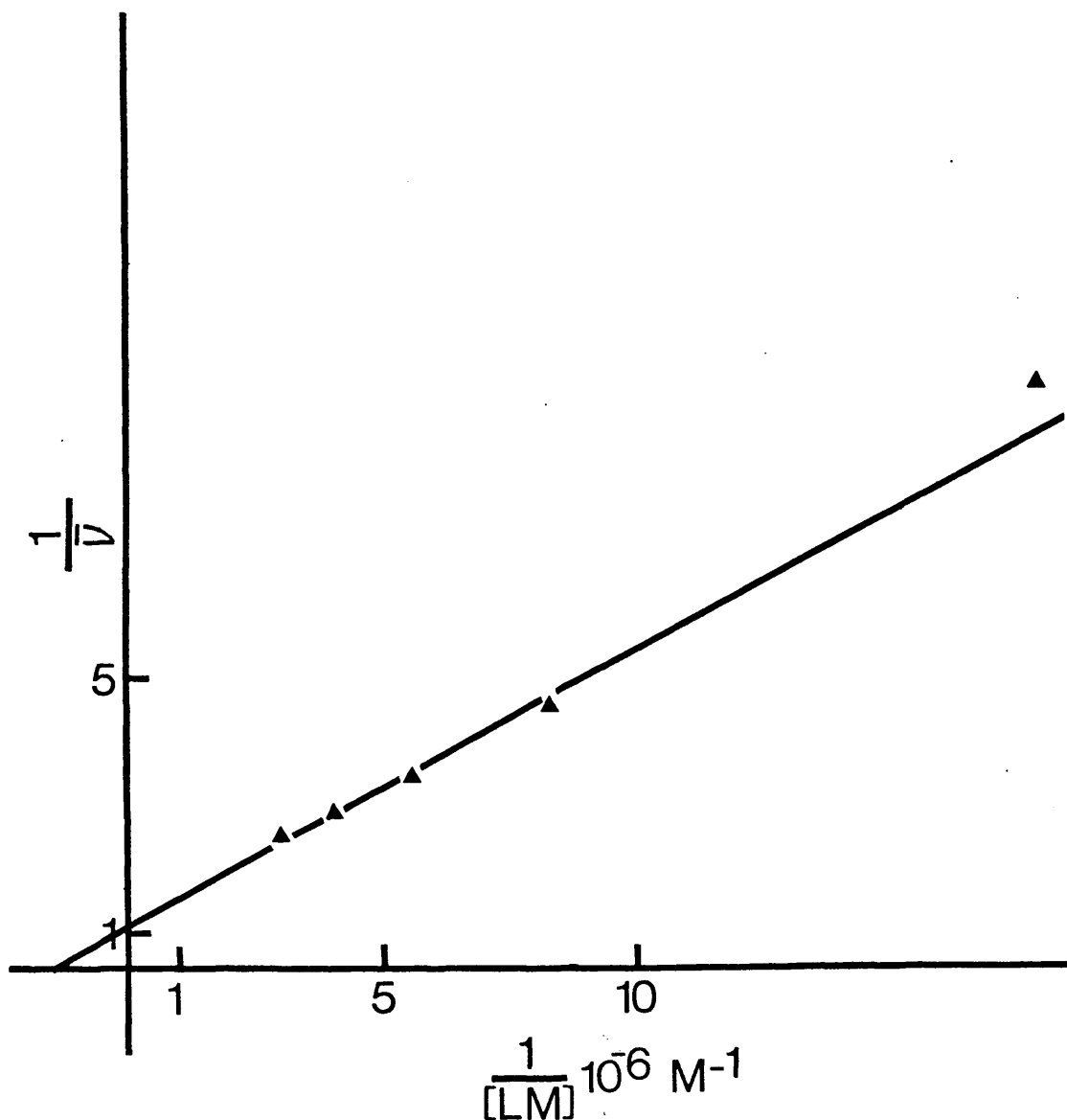


Fig. II-3 Representación de Klotz para fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas de A. Montana. Ensayo de diálisis en bolsas. Tiempo de incubación de 8 horas a  $0^\circ\text{C}$  con agitación suave. La concentración de ribosomas de 1.5 mg/ml y la concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) LM estaba comprendida entre  $10^{-7}$  M y  $2 \times 10^{-6}$  M.

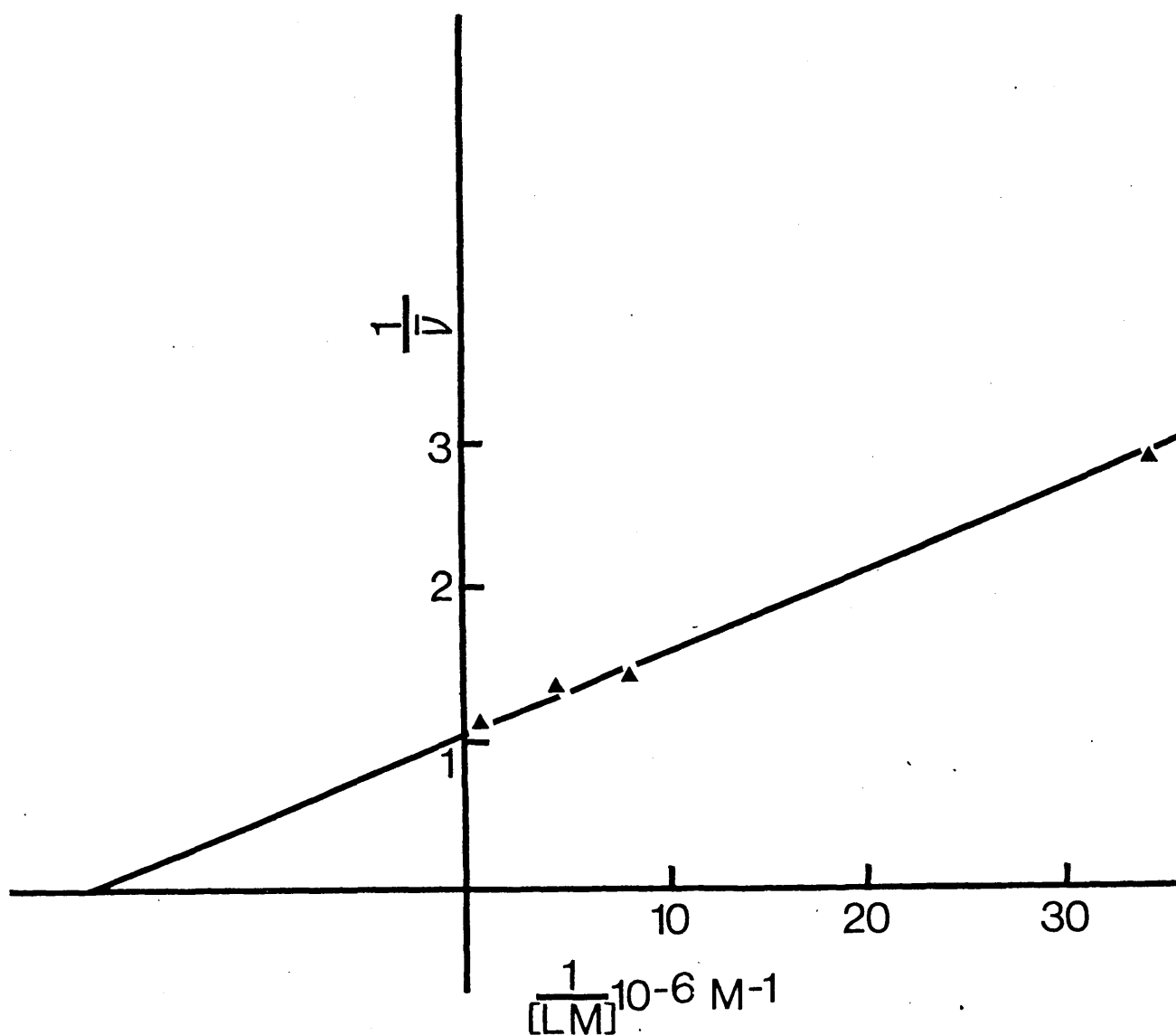


Fig. II-4. Representación de Klotz para fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas de A. Montana en presencia de 33 % de etanol (v/v) a 0°C. Ensayo en condiciones standard de sedimentación. La concentración de ribosomas empleada fué de 75 mg/ml y las concentraciones de ( $^{14}\text{C}$ ) LM variaron entre  $1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$  y  $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

de etanol, tanto en E. Coli como en A. Montana, y posiblemente en B. Subtilis. Por otra parte etanol, no produce variación en la esteoqui-  
metría de la fijación a ribosomas de A. Montana. Se observa también  
que en presencia de etanol la afinidad por LM de ribosomas de bacte-  
ria Gram positiva y algas azules es mayor que por las de bacterias -  
Gram negativas, en buena concordancia con su inhibición de la reacción  
de fragmento con puromicina (Celma, Tesis doctoral 1971) y a su vez  
con el efecto antibiótico in vivo.

#### Efecto de cloranfenicol en fijación de lincomicina.

Es ya conocido que fijación de cloranfenicol a ribosomas es inhi-  
bida por LM (Vázquez. 1967). Para estudiar la correlación en las fija-  
ciones de cloranfenicol y lincomicina, procedimos a ver el caso inver-  
so, es decir, inhibición de fijación de lincomicina por CM. Siguiendo  
nuestra pauta de comparación con las condiciones de la reacción del -  
fragmento, se hicieron experimentos sin etanol o en presencia de eta-  
nol a la concentración de 33% (v/v).

Como se ve en la figura II-6 (b) en el caso de presencia de eta-  
nol la inhibición por CM es completa, al igual que en el caso recípro-  
co. En el caso de no haber etanol se ha observado a su vez, total des-  
plazamiento de LM fijada por CM, fig. II-6 (a). A la vista de estos  
resultados de interpretación del hecho observado por nosotros de que

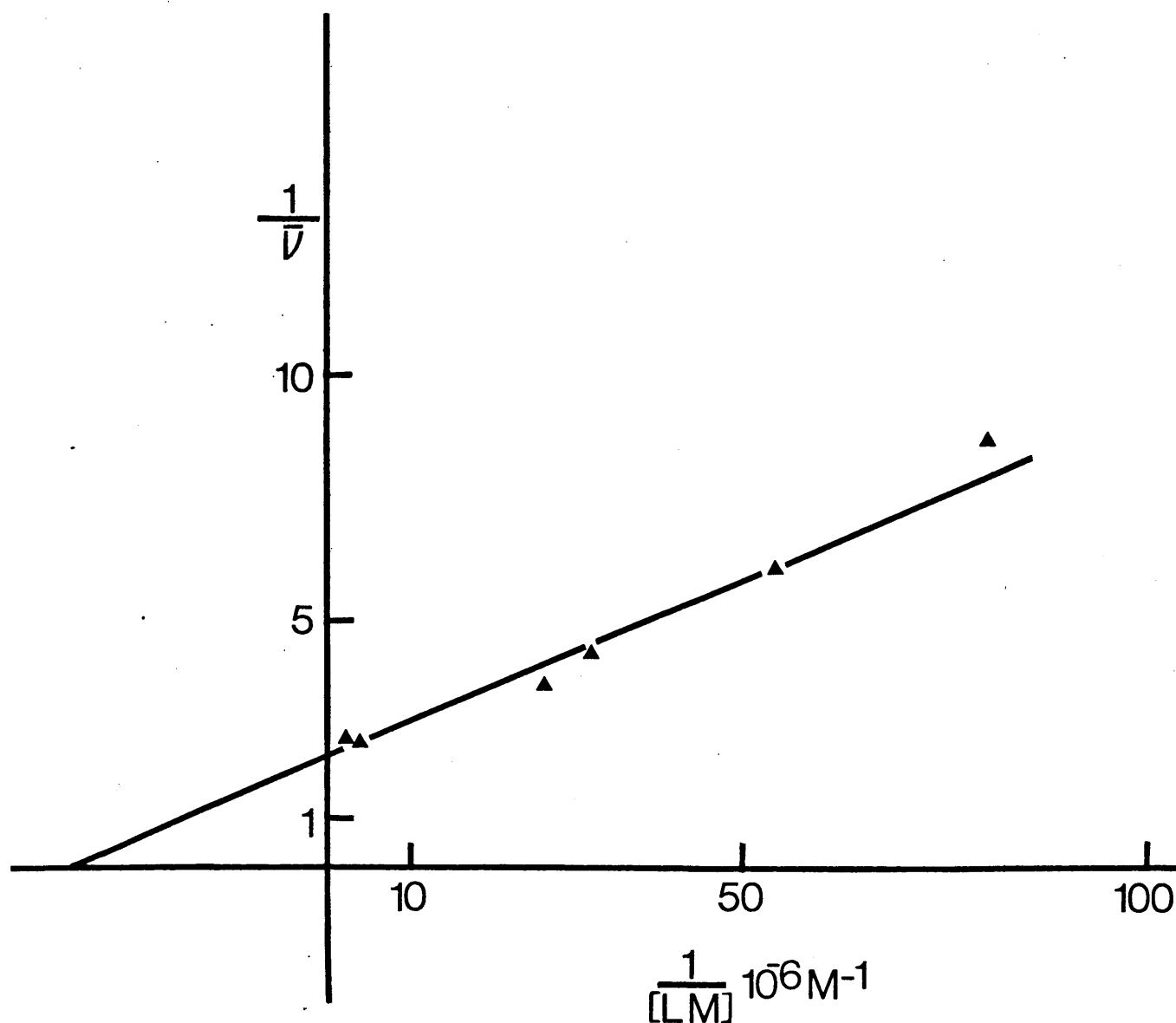


Fig. II-5. Representación de Klotz para fijación de ( $^{14}C$ ) LM a ribosomas de B. Subtilis en presencia de 33 % de etanol a 0°C. Condiciones estándar para ensayo de sedimentación con una concentración de ribosomas de 10 mg/ml y ( $^{14}C$ ) LM entre  $10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M.

LM no inhiba totalmente, en ciertos lotes de ribosomas, la fijación de CM parece ser debida a la pérdida de algunos ribosomas de la capacidad para fijar LM, más bien que a una competición parcial de ambos antibióticos por el ribosoma que se reflejaría en un efecto inhibitor también parcial de CM sobre fijación de LM.

Ya que en presencia de etanol tenemos seguridad de que existe - una competición de tipo exclusivo entre CM y LM, es decir que la fijación de uno de ellos no permite la del otro sobre el mismo ribosoma. Se siguió el método de Klotz para fijación de algunos colorantes a - albúmina de determinación de constantes. (Klotz, Triwush y Walker, - 1948).

Así se calculan las constantes de asociación aparentes del ligando marcado en presencia de una concentración constante del no marcado libre, en el equilibrio, como ya hemos indicado en el capítulo dedicado a Métodos.

En el caso de LM y CM existe el inconveniente de que al tener - los dos una constante de disociación del mismo orden, es difícil el mantener la concentración de antibiótico no marcado libre a lo largo de cada isoterma de fijación.

En la figura II-7, puede verse que tanto en caso de inhibición de CM por LM como en el recíproco, la constante deducida se mantiene constante y concuerda aceptablemente en la calculada directamente.



Fig. II-6 (a) Inhibición de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas - de E. Coli por CM medida en ensayo de ultracentrifugación tomando so lución descrito en métodos. Tiempo de incubación de 30 min. a  $0^{\circ}\text{C}$ . - Concentración de ribosomas de 8,5 mg/ml. La concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) LM es de  $2,5 \times 10^{-6}$  M y la de CM varía entre  $10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M.

(b) Inhibición de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas de E. Coli para CM en presencia de 33 % (v/v) de etanol. Método de sedimentación, la - incubación duró 40 min. a  $0^{\circ}\text{C}$ . La concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) LM es de -  $10^{-6}$  M y la concentración de CM varío desde  $5 \times 10^{-6}$  M a  $10^{-4}$  M.

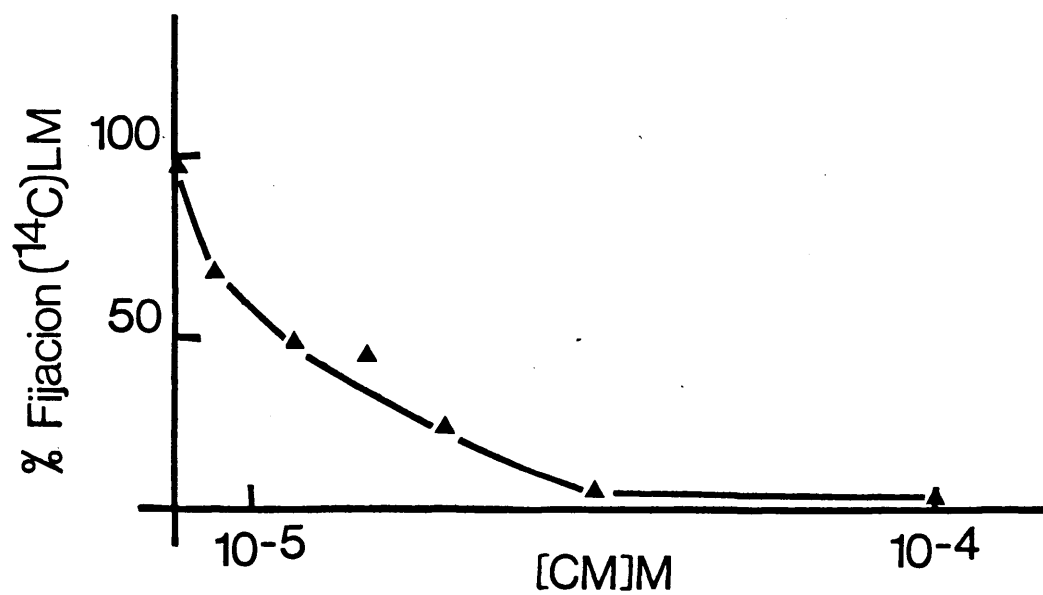
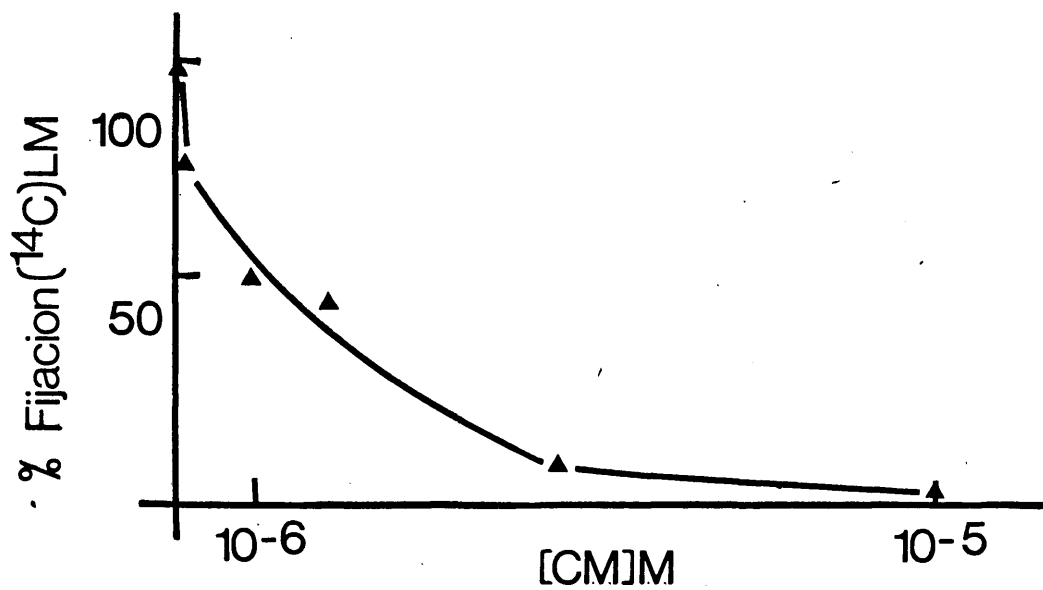


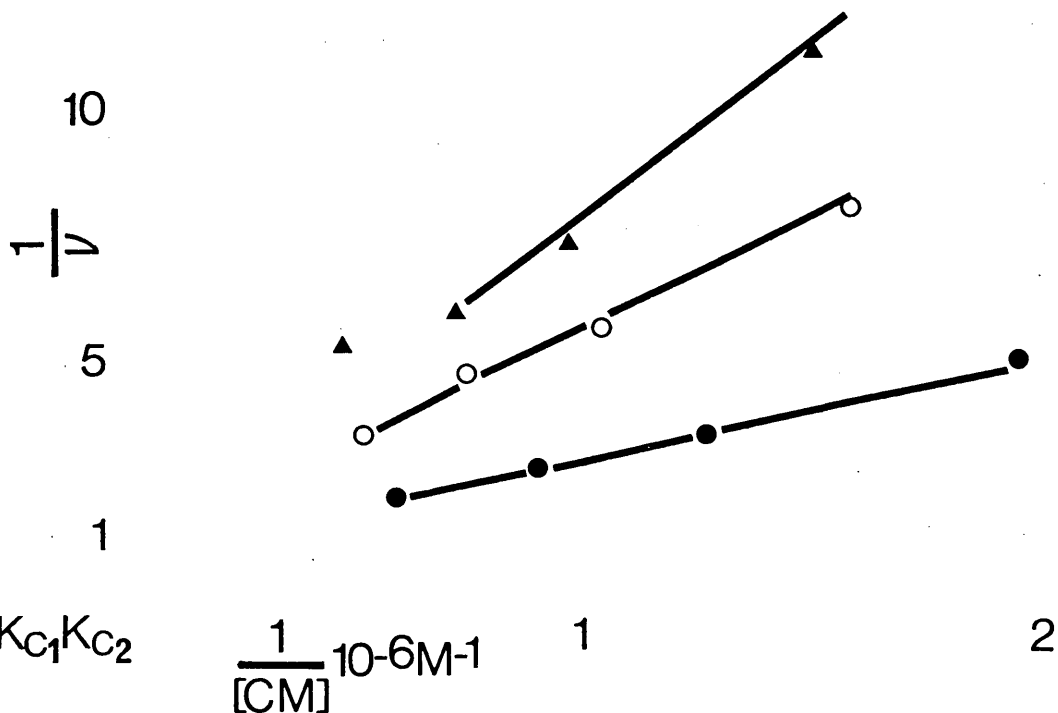
Fig. II-7. Método de Klotz de determinación de constantes de asociación a partir de constantes aparentes aplicado a  $(^{14}\text{C})$  CM -  $(^{12}\text{C})$  LM y  $(^{14}\text{C})$  LM -  $(^{12}\text{C})$  CM para ribosomas de E. Coli. Datos de experimentos hechos en presencia de 33 % de etanol en condiciones standard. La concentración de los ribosomas fue de 5 mg/ml y la variación del antibiótico radioactivo varió entre

○—○ CM+2×10<sup>-6</sup>M L

▲—▲ CM+4×10<sup>-6</sup>M L

$$K_l = \frac{1}{4 \times 10^{-6} M} \left( \frac{5}{1.4} - 1 \right) = \frac{1}{1.4 \times 10^{-6} M}$$

$$K_l = \frac{1}{2 \times 10^{-6} M} \left( \frac{5}{2.2} - 1 \right) = \frac{1}{1.35 \times 10^{-6} M}$$



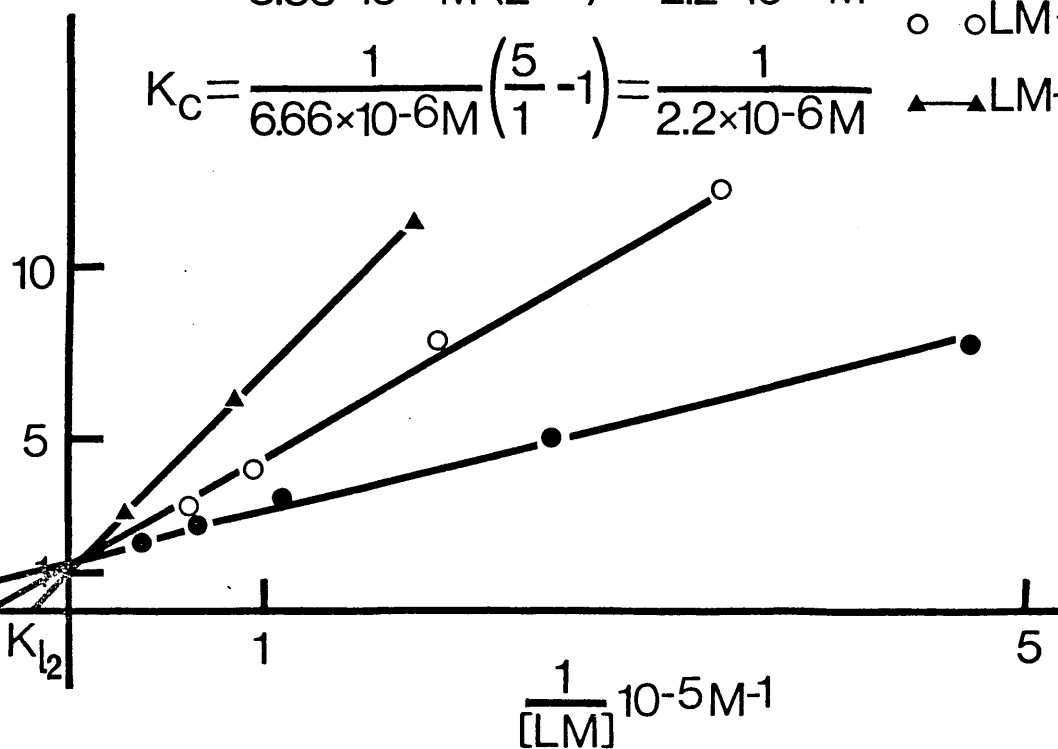
$$K_C = \frac{1}{3.33 \times 10^{-6} M} \left( \frac{5}{2} - 1 \right) = \frac{1}{2.2 \times 10^{-6} M}$$

$$K_C = \frac{1}{6.66 \times 10^{-6} M} \left( \frac{5}{1} - 1 \right) = \frac{1}{2.2 \times 10^{-6} M}$$

●—● LM

○—○ LM+6.6×10<sup>-6</sup>

▲—▲ LM+1.3×10<sup>-5</sup>



Así podemos corroborar el resultado de la competición exclusiva de CM y LM en su fijación a ribosomas en presencia de etanol, concluído anteriormente de las curvas simples de inhibición de fijación.

Estos hechos nos garantizan el uso del método en otras ocasiones en que no es posible determinar la fijación directa de un antibiótico.

#### Efecto de eritromicina sobre fijación de lincomicina.

Se realizaron experimentos de inhibición directa de fijación de LM por ER. Como se ha citado, ya se encontró en ribosomas de B. stea--rothermophilus (Chang y Weisblum 1967), que ER desplazaba a LM de su - asociación con aquellos. También nosotros hemos encontrado en E. Coli inhibición total como aparece en la figura II-8, no sólo en ausencia, sino también en presencia de etanol.

Dado que en ausencia de etanol la afinidad de LM por el ribosoma es menor, su desplazamiento por eritromicina tiene lugar a concentra ciones menores de ésta.

De estos resultados y de los de inhibición de fijación de eritro micina por LM deducimos que ambos antibióticos se excluyen totalmente en su fijación al ribosoma.

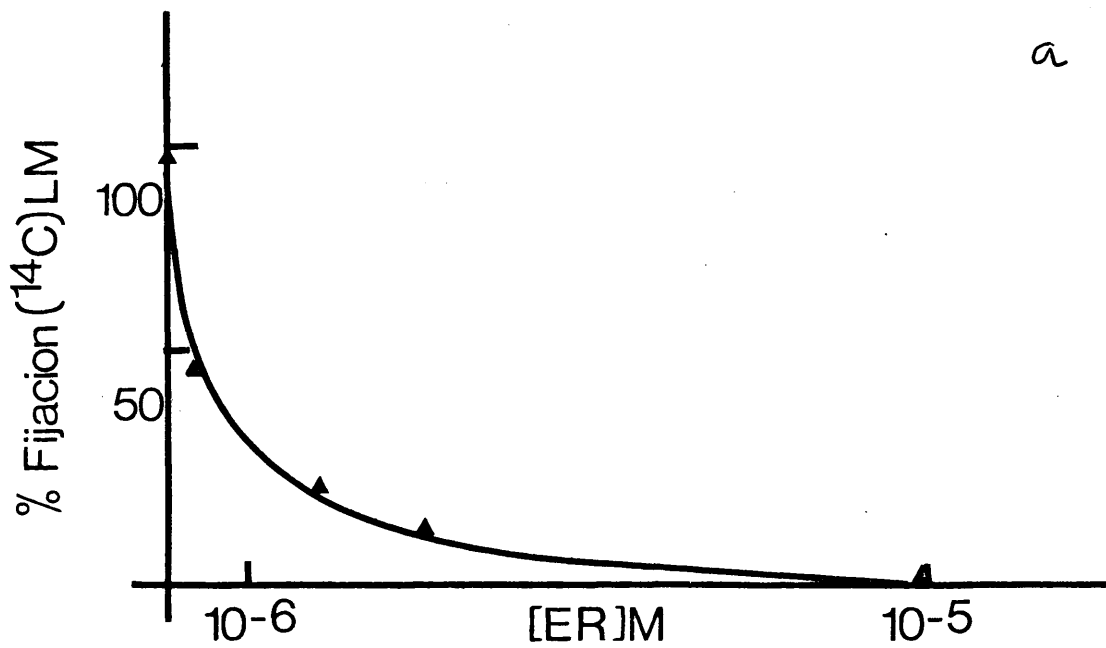
#### Acción de puromicina sobre fijación de lincomicina.

Es de interés el conocer la localización relativa de los sitios

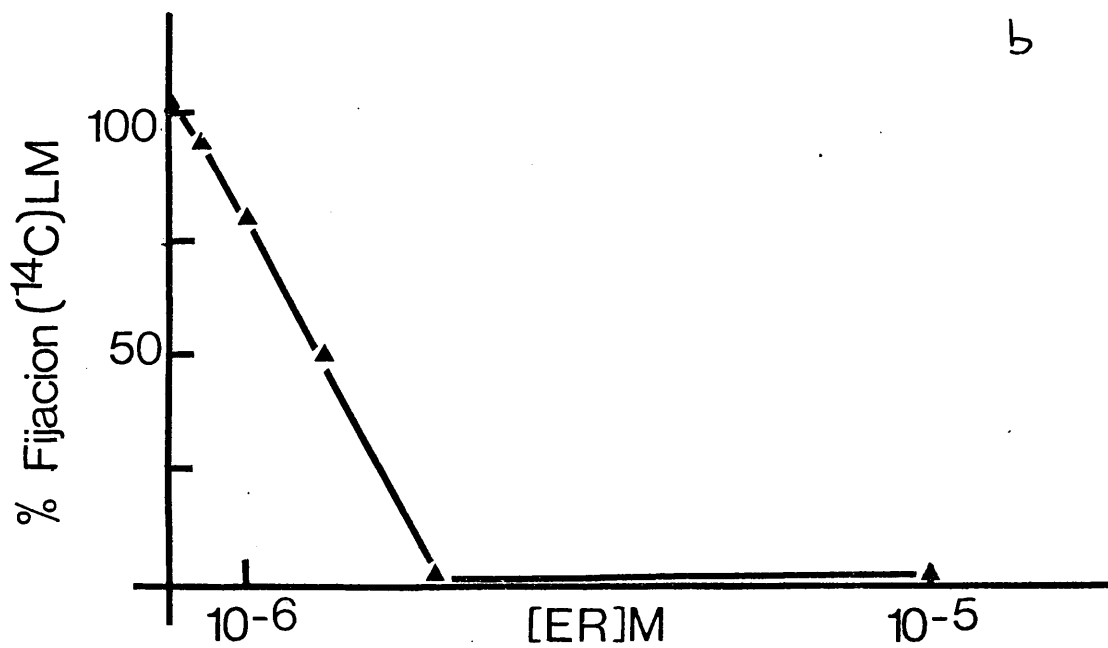
Fig. II-8 (a) Inhibición de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas - de E. Coli a partir de ensayo de ultracentrifugación. La concentración de ribosomas era de 12 mg/ml y la de ( $^{14}\text{C}$ ) LM de  $2,5 \times 10^{-6}$  M.

(b) Inhibición de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a ribosomas de E. Coli en presencia de 33 % de etanol. Condiciones standard con ribosomas a concentración de 6 mg/ml y de ( $^{14}\text{C}$ ) LM a  $10^{-6}$  M.

a



b



de fijación de LM y puromicina, dado el caracter de esta última de -  
poderse comportar como sustrato aceptor en la formación de enlace -  
peptídico.

Como se dijo en la introducción LM desplaza totalmente al sus-  
trato aceptor simplificado CACCA-Leu ó UACCA-Leu (Celma, Tesis doc-  
toral).

El conocer como interacciona en presencia de puromicina, sustrato  
aceptor aún más localizado por su menor tamaño, en el centro enzim  
ático peptidil transferasa nos permite concretar su sitio de fija-  
ción. Así pues se procedió a realizar experimentos de inhibición de  
fijación de LM por PM. En la figura II-9 puede verse que en ensayo -  
de etanol a concentración crecientes de puromicina, LM se desplaza  
de su fijación hasta un 60% para una concentración de PM de  $10^{-2}$  M.  
en que ya permanece constante. Se empleó Clorhidrato de PM neutralizad  
o a pH 8 con NaOH. El ClNa a la concentración equivalente, hemos dem  
ostrado que no ejerce inhibición en esa fijación. Esto puede signifif  
icar bien una competición parcial por los mismos sitios de fijación o  
por un número menor de ellos para puromicina o bien una competición  
exclusiva para este último caso. Para decidir sobre estas alternati-  
vas es necesario ver los resultados de inhibición de fijación de PM  
por LM (cap. III).



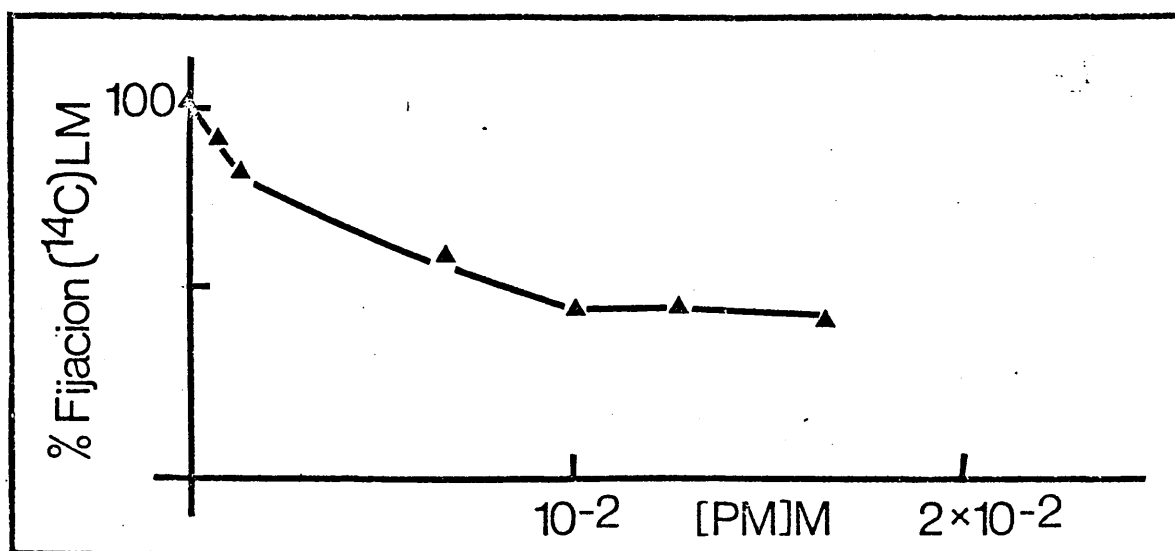


Fig. II-9 Inhibición de fijación de (<sup>14</sup>C) LM por PM en presencia de 33 % de etanol. Ensayo de sedimentación en condiciones standard con una concentración de ribosomas de 11 mg/ml y de (<sup>14</sup>C) LM de 10<sup>-6</sup> M. - El clorhidrato de PM se neutralizó con NaOH hasta pH 7,5. El efecto - del Na<sup>+</sup> se comprobó era nulo a estas concentraciones en la fijación - de LM.

Efecto de una serie de inhibidores de biosíntesis de proteínas  
sobre fijación de lincomicina.

Cuando se incubaron simultáneamente con LM una serie de inhibidores de biosíntesis de proteínas, que actúan en la elongación de la - cadena peptídica, las inhibiciones producidas por cada uno de ellos en la fijación de aquel se expresan en la tabla II-3.

TABLA II-3

INHIBICION DE FIJACION DE  $^{14}\text{C}$  LINCOMICINA POR ANTIBIOTICOS

<u>Antibiótico añadido</u>	<u>Conc. (mM)</u>	<u>% Inhibición de fijación de <math>^{14}\text{C}</math> LM</u>
Estreptogramina A	0.1	100
Estreptogramina B	0.1	95
Viridogriseina	0.1	100
Amicetina	0.1	0
"	1	0
Esparsomicina	0.1	15
"	1	25
Gougerotina	0.1	0
"	1	—
Siomicina	0.1	0
Tioestrepton	0.01	0
Bottromicina	0.01	7
"	0.1	9

<u>Macrólidos</u>	<u>Conc. (mM)</u>	<u>% Inhibición de fijación de <math>^{14}\text{C}</math> LM</u>
Eritromicina	0.1	100
Espiramicina III	0.1	100
Neospiramicina III	0.1	100
Forocidina III	0.1	100
Carbomicina	0.1	100
Oleandomicina	0.1	100
Angolamicina	0.1	90
Lancamicina	0.1	90
Metemicina	0.1	46
Chalcomicina	0.1	80

Datos de experimentos de precipitación con Etanol. La concentración de  $^{14}\text{C}$  lincomicina es de  $10^{-6}$  M. La concentración de ribosomas de 5 mg/ml. Los antibióticos desecados, se enfrentaron simultáneamente a LM con los ribosomas. Incubación 30 min. a 0°C.

Estreptogramina A como Estreptogramina B o su análogo viridogriseina inhiben totalmente fijación de LM. Como se sabe por los experimentos de competición de fijación (Ennis, 1971) y por su efecto sobre fijación de sustratos simplificados de peptidiltransferasa (Celma, - Monro y Vázquez 1971) estreptogramina A y estreptogramina B o viridogriseina, se fijan a distintos sitios del ribosoma. El que todos ellos excluyan la fijación de LM indica que o bien solapan todos ellos

con el sitio de fijación de LM, lo que sugeriría una gran proximidad de sus sitios de interacción, o bien al fijarse modifican al ribosoma distorsionando el sitio de fijación de LM.

Esparsomicina llega a inhibir como máximo, al ir aumentando su concentración el 25% la fijación de LM. Esto hace pensar en una competición parcial de ambos antibióticos, lo cual explicaría posiblemente parte del efecto bloqueante de LM en la fijación de CACCA-Leu-Ac al ribosoma dependiente de esparsomicina. (Monro, Celma y Vázquez - 1969).

Gougerotina y amicetina no inhiben en absoluto fijación de LM - por lo que sus sitios de acción son diferentes.

Tanto siomicina como su análogo tioestrepton inhibidores de la elongación de la cadena peptídica por impedir la fijación del factor G de translocación al ribosoma (Modolell, Monro y Vázquez 1971), no inhiben en absoluto la unión de LM a los ribosomas. Dado que LM es - inhibidor del enzima peptidiltransferasa interaccionando con ambos - sustratos (Celma, Monro y Vázquez 1970, 1971), esto indica cierta separación entre aquel enzima y el lugar de interacción de dicho factor G.

Ya se ha descrito inhibición de fijación de LM por eritromicina a ribosomas de B. stearothermophilus. (Chang y Weisblum 1967).

Así mismo se ha visto inhibición de fijación de eritromicina -

por LM en ribosomas de B. Subtilis (Wilheim, Oleinick y Corcoran - 1967) y por nosotros en los de E. Coli (capítulo IV). Basándose en las pruebas de interacción de ambos antibióticos en su fijación directa, en sus capacidades de inhibir la síntesis de proteínas, así como en la analogía estructural de LM y los macrólidos por poseer un resto de azúcar, se ha postulado un mecanismo común de acción para LM y macrólidos (Wilheim, Oleinick y Corcoran 1967).

Nosotros aquí ensavamos la interacción de LM en presencia de varios macrólidos pertenecientes a los distintos grupos enque han sido clasificados por Mao y Wiegand (1967), según su basicidad. Según puede observarse en la tabla II-4 todos estos macrólidos son buenos inhibidores de fijación de LM. Aunque, eritromicina, oleandomicina, forocidina y neoespiramicina, no son inhibidores de la formación de enlace peptídico (Monro, Fernández-Muñoz, Celma y Vázquez 1970), su inhibición de fijación de LM, situa su unión en el ribosoma en las proximidades de aquel centro enzimático.

#### Actividad in vitro de lincomicina y algunos análogos sobre siste- mas de E. Coli. Posible razón de su diferente actividad in vivo.

Entre los derivados de lincomicina obtenidos por síntesis se han encontrado algunos con mayor actividad que ésta. Así clindamicina - (CL) es más efectiva que lincomicina, tanto en bacterias Gram positi

vas como Gram negativas. Algunos derivados de lincomicina actúan como plasmodicidas, tal es el caso de clindamicina y 7 Cloro-7 deoxi-N-de-metil-4'-pentil-lincomicina (U-24729-A). Así como clindamicina tiene una actividad 15 veces mayor que lincomicina sobre E. Coli in vivo, su isómero óptico epiclindamicina posee mucha menor actividad. También se incluye en el grupo de estos antibióticos la celesticetina, aislado de *Str. caelestis*, con fuerte actividad sobre bacterias Gram positivas especialmente algunas especies de estreptococos y de muy - baja actividad en Gram negativas.

Con objeto de esclarecer si las diferencias de actividad de estos antibióticos es debida a distintos efectos en biosíntesis de proteínas o bien primordialmente se debía a diferente grado de permeabi-lidad o metabolismo, ensavamos algunos de estos antibióticos en siste-mas simplificados de biosíntesis de proteínas.

Primeramente probamos su acción en un sistema con extracto S<sub>100</sub> de E. Coli para incorporación de fenilalanina dirigida por Poli U. El resultado aparece en la tabla II-4.

Puede observarse un efecto similar de LM, CL y U-24729-A, mientras que EPI-CL y CE tienen menor actividad correlacionándose con su efec-to in vivo.

A continuación buscando el distinto efecto sobre la formación - del enlace peptídico, ensavamos los anteriores inhibidores en la rea-

ción del fragmento CACCA-Leu-Ac con PM, los resultados aparecen en -  
la tabla II-5.

TABLA II-4

## EFECTO DE LINCOMICINA Y ANALOGOS SOBRE SINTESIS DE POLIFENILALANINA

EN E. COLI

<u>Antibiótico</u>	<u>Conc.</u>	CPM precipitables	% de control de
		<u>por TCA</u>	<u>fenilalanina incorporada</u>
Ninguno	-----	1075	100
Lincomicina	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	240	24
Clindamicina	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	210	20
Epiclindamicina	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	520	48
U 24729 A	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	107	10
Celesticetina	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	570	53

Ensayo realizado según se indicó en métodos. Tiempo de incubación 5 min. a 37°C. Se añadió como sustrato ( $^{14}\text{C}$ )fenilalanil tRNA.

Puede concluirse de este experimento que en líneas generales, -  
exceptuando la menor inhibición por parte de clindamicina correlacio  
na con el de incorporación de fenilalanina.

TABLA II-5

EFECTO DE LINCOMICINA Y ANALOGOS EN REACCION DEL FRAGMENTO CACCA-Leu-Ac

<u>Antibiótico añadido</u>	<u>Conc.</u>	<u>CPM Ac Leu-PM formadas</u>	<u>% Reacción</u>
—		705	100
Lincomicina	$6,6 \times 10^{-6} M$	210	30
Clindamicina	$6,6 \times 10^{-6} M$	410	57
Epiclindamicina	$6,6 \times 10^{-6} M$	600	85
U 24729 A	$6,6 \times 10^{-6} M$	210	30

Condiciones usuales. Incubación 5 min. a 0°C. Ribosomas a con  
tración de 1 mg/ml.

Se trató de estudiar la afinidad relativa de estos antibióticos en su fijación al ribosoma. Al disponer solamente de ( $^{14}C$ ) LM y ( $^{14}C$ ) clindamicina y fijarse ambos reversiblemente en presencia de etanol, ensayamos la inhibición de la fijación de ambos por el resto en ensa  
yo de precipitación con etanol, al ser mucho mas sensible esta prueba que en ausencia del alcohol. El resultado aparece en la tabla II-6.

A la vista de estos resultados pueden deducirse varias consecuen  
cias: lincomicina y clindamicina parece ser compiten por el mismo si



TABLA II-6

FIJACION DE  $^{14}\text{C}$  LINCOMICINA Y  $^{14}\text{C}$  CLINDAMICINA A RIBOSOMAS DE E. COLI

EFECTO DE ANTIBIOTICOS DEL GRUPO DE LINCOMICINA

<u>Antibiótico añadido</u>	<u>Conc. (<math>\mu\text{M}</math>)</u>	% Fijación de control de	
		<u>(<math>^{14}\text{C}</math>) lincomicina</u>	<u>(<math>^{14}\text{C}</math>) clindamicina</u>
Lincomicina	5	—	30
	500	—	0
Clindamicina	1	90	—
	300	0	—
Epiclindamicina	1	100	—
	5	—	65
	300	0	—
	500	—	0
U 24729 A	1	85	—
	5	—	50
	300	0	—
	500	—	0
Celesticetina	1	80	—
	300	13	—
	1000	10	—

Experimentos de fijación por el método de precipitación con etanol a 33% (v/v). La concentración de ( $^{14}\text{C}$ ) LM es  $10^{-6}$  M y la de ( $^{14}\text{C}$ ) CM  $5 \times 10^{-6}$  M. Cuando se usan " — " significa no realizado.

tio, ya que ambos se excluyen en su fijación, ahora bien, LM tiene -  
 más afinidad que clindamicina puesto que enfrentadas en cantidades -  
 equimoleculares con los ribosomas LM inhibe un 70% la fijación de -  
 clindamicina, mientras que clindamicina inhibe sólo un 10% la fija-  
 ción de LM.

Esto concuerda con el resultado de la reacción de fragmento -  
 con puromicina. Por otro lado epiclindamicina y U 24729 A inhiben to-  
 talmente fijación de LM y clindamicina, mientras que celesticetina -  
 lo hace hasta el 90%.

Puede tenerse un criterio indirecto aproximado de la distinta -  
 afinidad teniendo en cuenta que, si existe competencia, se cumpla la  
 relación:

$$\frac{\bar{V}_A}{\bar{V}_B} = \frac{K_A}{K_B} \times \frac{(A)}{(B)}$$

y entonces el porcentaje de inhibición de fijación de LM o clindamici-  
 na por la misma concentración de los distintos antibióticos es propor-  
 cional a su constante de asociación. Así, parece que la afinidad de-  
 crece en el orden LM > U 24729 A >> clindamicina > celesticetina > e-  
 piclindamicina, aunque en reacción del fragmento LM y U 24729 A inhi-  
 ban lo mismo.

Con objeto de ver si estas afinidades mantienen este orden sin  
 etanol y dada la dificultad en encontrar fijación sensiblemente -

cuantificable de ( $^{14}\text{C}$ ) LM y ( $^{14}\text{C}$ ) CL, en estas condiciones hicimos - una aproximación estudiando la inhibición que producían estos antibióticos sobre una concentración constante de  $^{14}\text{C}$  CM en un experimento de diálisis. El resultado aparece en la tabla II-7.

TABLA II-7

FIJACION DE  $^{14}\text{C}$  CLORANFENICOL. EFECTO DE ANTIBIOTICOS DEL GRUPO DE LINCOMICINA.

<u>Antibiótico añadido</u>	<u>Conc. (<math>\mu\text{M}</math>)</u>	<u>CPM fijadas</u>	<u>% Fijación de (<math>^{14}\text{C}</math>) cloranfenicol</u>
Ninguno	----	1110	100
Lincomicina	300	670	60
Clindamicina	300	535	48
Epi-clindamicina	300	785	70
U 24729 A	300	435	39
Celesticetina	300	880	80

Experimento de diálisis en bolsas de celofan. La concentración de  $^{14}\text{C}$  CM es de  $10^{-6}$  M, la de ribosomas de 10 mg/ml. Tiempo de incubación 20 horas. Se tomaron muestras de 0,05 ml para medir radioactividad y de 0,005 ml para leer densidad óptica de los 0.200 ml que hay en cada bolsa.

Se observa correlación entre estas afinidades y la inhibición - de la incorporación de fenilalanina. ( Tabla II-4 ). Parece que en - presencia de etanol se estimula más la fijación de LM que la de - U-24729-A.

Con objeto de ver si clindamicina debe su efecto contra plasmo- dios por acción sobre sus ribosomas, citoplásmicos 80S, ensayamos su fijación en ribosomas de tipo 80S de la levadura Saccharomyces cere- visiae no habiendo ninguna fijación, según se ve en tabla II-8.

TABLA II-8

FIJACION DE CLINDAMICINA A RIBOSOMAS 80S COMPARADA CON 70S

	<u>CPM de <math>^{14}\text{C}</math> clindamicina fijadas</u>
Ribosomas E. Coli	260
Ribosomas S. Cerevisiae	0

---

Ensayo de etanol. Concentración de ambos ribosomas a 7 mg/ml. - Incubación de 0.1 ml 30 min. a 0°C, tomar 0.075 ml.

A la vista de estos resultados puede concluirse que la mayor ac- tividad en bacterias de clindamicina y U 24729 A que lincomicina pa- rece debido no a un mayor efecto sobre la biosíntesis de proteínas - en los ribosomas, sino que es debido a otras causas, probablemente -

mayor permeabilidad celular.

Esta última hipótesis parece también ser cierta en tejidos de seres superiores, pues se ha observado una mayor acumulación de clindamicina que de lincomicina en sangre, tras administración oral de ambos.

Sin embargo la baja actividad de epiclindamicina parece deberse a su baja afinidad por los ribosomas, al menos en gran parte. Celesceticina es de aún mas baja actividad en Gram negativas que lincomicina y puede deber este efecto a su más baja afinidad por los ribosomas, pero hay que considerar por otro lado el distinto efecto que tiene en la fijación de sustratos de peptidiltransferasa. (Celma, y col. 1970).

En cuanto a la actividad antiplasmodio de clindamicina y U 24729 A probablemente sea debida a efectos en los ribosomas "mitocondriales". No obstante es posible, aunque poco probable, que estos antibióticos tengan actividad en ribosomas 80S de protozoos aunque no se fijen a ribosomas 80S de levadura.

### Capítulo III

#### FIJACION DE PUROMICINA A RIBOSOMAS DE E. COLI

Es importante el conocer la fijación de puromicina al ribosoma por colocarse en el mismo sitio ribosómico que la parte CCA-Amino-acil del aminoacil-tRNA, en el centro enzimático peptidiltransferasa. El pequeño tamaño de la molécula de puromicina permite circunscribir las interacciones en el sitio aceptor de aquel enzima.

No se ha descrito fijación directa de puromicina al ribosoma - probablemente por la escasa afinidad que tiene por él mismo, lo cual exige el añadir altas concentraciones del antibiótico radioactivo o bien usarlo de alta actividad específica a la vez que disponer de una técnica suficientemente sensible para detectar esta fijación.

Otro factor que dificulta la medida de fijación de puromicina - al ribosoma es la presencia de peptidil-tRNA situado, bien en el sitio aceptor, inhibiendo su fijación la del antibiótico con el ribosoma, o en el sitio donador reaccionando con la puromicina para formar peptidil-puromicina que puede acompañar a los ribosomas en algunos - ensayos de fijación, tal como precipitación con etanol, dando valores por exceso de puromicina fijada. Efectivamente se ha observado que - ribosomas que no han experimentado el previo tratamiento con puromicina, dan una fijación considerablemente mayor que los que han sido

tratados. Como para los otros antibióticos estudiados, se ha ensayado fijación en ausencia y en presencia de etanol, y dada la pequeña diferencia entre la radioactividad total y la libre en el equilibrio para obtener datos significativos se requeriría una gran concentración de ribosomas. Por esto hemos preferido comenzar por medir directamente radioactividad fijada en el precipitado de ribosomas con la correspondiente corrección de solución que embebe. Para hacer esta corrección hemos considerado adecuado el añadir un exceso de puromicina no marcada de modo que la actividad específica descienda entre mil y diezmil veces, con lo cual aunque la fijación aumente, pues trabajamos lejos de saturación de ribosomas, queda reducida a menos de un 1%. Esto lo comprobamos variando la concentración de puromicina fría y observando que no descendía la radioactividad retenida en el precipitado.

También se hizo control de presencia de peptidil-puromicina en los precipitados. Para ello se incubaron ribosomas con el antibiótico radioactivo un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio; paralelamente se incubó otra porción de ribosomas en presencia de antibiótico radioactivo a la misma concentración más el exceso del no marcado, que daría puromicina embebida en el sedimento ribosómico. Al acabar este periodo de incubación a una porción de los incubados sólo - en presencia de puromicina radioactiva, se le añade el exceso de no marcada. Dado que la formación de peptidil-puromicina es irreversible

estos controles nos darían la cantidad de puromicina que estuviera - precipitada irreversiblemente unida, formando peptidil-puromicina. - Tambien se controló que en esta segunda incubación no hubo variación significativa de fijación total, respecto a la primera.

En la tabla III-I puede verse una de éstas pruebas de control - de fijación.

Como se observa en la tabla III-I la proporción de puromicina no revertida por la no marcada no es considerable, variando de unos experimentos a otros dentro de un margen de un 10 % de la embebida, - por defecto o por exceso.

Que la concentración de puromicina no marcada es suficiente para reducir la radioactividad fijada a cantidades despreciables, se muestra en tabla II-2.

Parece ser que detectamos una fijación reversible de puromicina a concentraciones inhibitoras del antibiótico. Intentamos el trazar su isoterma, pero debido a la baja afinidad no podemos alcanzar la saturación necesaria.

Antes de proseguir con las experiencias en presencia de etanol, intentamos ver si esta fijación puede también detectarse en ausencia de etanol. Así pues, seguimos un método análogo pero teniendo más - precaución en el lavado del tubo dada la mayor facilidad del sedimento de ribosomas para resuspenderse. Los resultados se muestran en la



tabla III-3.

TABLA III-I

FIJACION DE ( $^3\text{H}$ ) PUROMICINA A RIBOSOMAS DE E. COLI EN CONDICIONES DE  
REACCION CON FRAGMENTOS

INCUBACION		CPM en PRECIPITADO		
0 min a 60 min	60 min a 120 min	EXP.	I	2
-----	( $^3\text{H}$ ) PM		567	1410
( $^3\text{H}$ ) PM	( $^3\text{H}$ ) PM		595	1280
-----	( $^3\text{H}$ ) PM ( $^1\text{H}$ ) PM		425	870
( $^3\text{H}$ ) PM	( $^3\text{H}$ ) PM ( $^1\text{H}$ ) PM		450	840

Se incubaron muestras que en un volumen de 0,2 ml contenían: solución salina standard y 33 % de etanol (v/v); ribosomas a concentraciones de 8 y 13 mg/ml en experimentos I y 2 respectivamente y ( $^3\text{H}$ ) PM a  $10^{-6}$  M y ( $^1\text{H}$ ) PM a  $1,25 \times 10^{-3}$  M, cuando se indica. Los antibióticos se secaron a vacío en los tubos de reacción pasándose la solución de unos tubos a otros cuando se requería. Al final de la incubación los tubos se centrifugaron a 150.000 g. durante 20 min. Se recogió todo el líquido y se descartó, se enjuagaron los precipitados suavemente por tres veces consecutivas con la solución de incubación a 0°C. Eliminado el líquido de lavado se dejaron secar a vacío para eliminar restos de éste. Se añadió 0,125 ml por tubo, de agua y después de resuspender los ribosomas se midió radioactividad de una alícuota de 0,1 ml en contador de centelleo.

TABLA II-2

## CONTROL DE RADIOACTIVIDAD EMBEBIDA EN SEDIMENTO

## INCUBACION

$M(^3H)$ PM	$M(^3H)$ PM	CPM EN SEDIMENTO
$10^{-6}$	$1,25 \times 10^{-3}$	1325
$10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-3}$	1300
$10^{-6}$	0	2600

Las condiciones de ensayo fueron como las indicadas en tabla - III-I, siendo la concentración de ribosomas de 13 mg/ml. Se incubó - durante 60 min. se resuspendió el precipitado en 0,15 ml y se tomó - 0,1 ml de 0,15 ml.

Se observa en la tabla III-3 que existe una fijación reversible calculándose, suponiendo que puromicina fija una molécula por ribosoma, a partir de la densidad óptica de los ribosomas resuspendidos - (0,50 unidades por sedimento) una constante de disociación aproximada de  $7 \times 10^{-5}$  M; mientras que en experimentos con etanol ésta es de aproximadamente  $3 \times 10^{-4}$  M. Así pues, parece ser que el etanol disminuye la afinidad de puromicina por el ribosoma.

Efecto de antibióticos en la fijación de puromicina a ribosomas de E. Coli

Como dijimos anteriormente, es de interés situar el sitio de fi

TABLA III-3

FIJACION DE ( $^3\text{H}$ ) PM A RIBOSOMAS DE E. COLI

## INCUBACION

<u>0 min a 30 min</u>	<u>30 min a 60 min</u>	<u>CPM EN SEDIMENTO DE RIBOSOMAS</u>
( $^3\text{H}$ ) PM	( $^3\text{H}$ ) PM ( $^1\text{H}$ ) PM	4935
-----	( $^3\text{H}$ ) PM	9346
( $^3\text{H}$ ) PM	( $^3\text{H}$ ) PM	9120

Las muestras de incubación en volúmenes de 0,2 ml contenían: solución salina standard, 23 mg/ml de ribosomas pretratados con puromicina como se indicó en sección de métodos y ( $^3\text{H}$ ) PM a concentración  $10^{-6}$  M y ( $^1\text{H}$ ) PM a  $2,5 \times 10^{-3}$  M, cuando se indica. Se incubó a 0°C. Los antibióticos se habían secado previamente a vacío y cuando fué preciso se pasó la solución de unos tubos a otros sin variar el volumen. Al finalizar el tiempo indicado se centrifugaron a 150.000 g - por 3 horas. Se tomó una alícuota de líquido, se eliminó totalmente el resto y entonces se enjuagó el sedimento con solución standard a 0°C, lavándose a continuación cuidadosamente las paredes del tubo con la misma solución. Se secaron a vacío para eliminar el resto de solución y una vez secos se añadió 0,125 ml de agua por tubo, se resuspendieron los ribosomas y se midió la radioactividad en alícuotas de 0,1 ml.

En este ensayo también se midió la densidad óptica de los resuspendidos de ribosomas y la radioactividad del líquido que los cubría en el caso de llevar sólo ( $^3\text{H}$ ) PM para hacer un cálculo aproximado de la constante de disociación.

jación de los antibióticos que actúan en la zona del centro enzimático peptidiltransferasa con respecto al de la puromicina. Existen da-

tos indirectos, obtenidos a partir de medidas cinéticas de inhibición de la reacción de puromicina con N-acetil-amino-acil-tRNA, de varios antibióticos como cloramfenicol y esparsomicina. (Goldberg 1967) (Pestka 1970) pero ofrecen dudas por su complejidad. Nosotros hemos querido estudiar estas competiciones en nuestro sistema más simplificado de formación de enlace peptídico (reacción del fragmento) y correlacionar cuando sea posible estos datos con las medidas de competición directa con el substrato puromicina.

Comenzamos por estudiar el efecto de cloramfenicol y lincomicina, que como hemos visto en capítulos anteriores son parcialmente desplazados por puromicina, para completar las características de su interacción con el ribosoma.

Hemos ensayado a su vez el antibiótico esparsomicina, inhibidor de formación de enlace peptídico y que forma un complejo muy estable del sustrato CACCA-Leu-Ac con el ribosoma, de modo que le hace no reactivo con puromicina.

Se ha ensayado también eritromicina que estimula significativamente la formación de enlace peptídico con puromicina bloqueando el efecto inhibidor de algunos de los inhibidores de esta reacción como cloramfenicol y lincomicina (Celma, Tesis doctoral).

Así en la tabla III-4 pueden verse estos efectos.

TABLA III-4

## EFECTO DE INHIBIDORES EN FIJACION DE PUROMICINA A RIBOSOMAS DE E. COLI

## CONDICIONES DE REACCION CON FRAGMENTO

ANTIBIOTICO AÑADIDO	CONC. (M)	CPM FIJADAS	
		(sustraído el blanco)	% FIJACION
I.- Blanco	-----	1370	-----
-----	-----	1250	100
Cloranfenicol	$10^{-4}$	690	55
	$5 \times 10^{-3}$	775	62
Lincomicina	$10^{-4}$	230	19
	$5 \times 10^{-3}$	225	18
2.- Blanco	-----	1400	-----
	-----	875	100
Esparsomicina	$5 \times 10^{-4}$	0	0
Eritromicina	$10^{-4}$	1152	130

Condiciones descritas en tabla III-1. La concentración de ( $^3\text{H}$ ) PM es de  $10^{-6}$  M y los controles se han hecho simultáneamente añadiendo  $1,25 \times 10^{-3}$  M de ( $^1\text{H}$ ) PM no habiendo mas diferencia de un 10 % entre añadido simultáneamente o al final de la incubación. La concentración de ribosomas es de 13 mg/ml en los experimentos 1 y 2. Muestras de 0,2 ml se incubaron 1 y 2 horas como anteriormente. Se resuspendió el precipitado en 0,15 ml y se midió la radioactividad en 0,1 ml.

Cálculo aproximado de constante de disociación de puromicina en presencia de etanol.

En el experimento I de la tabla III-3 se midió radioactividad en alícuotas de la solución una vez precipitados los ribosomas, esto nos da una medida de la concentración del antibiótico libre en el equilibrio. Con estos datos y suponiendo que existe un sitio de fijación - para puromicina por ribosoma aplicando la ecuación  $K_d = \frac{(PM) \cdot (R)}{(R-PM)}$ , - donde (PM) y (R) son concentraciones de PM y ribosomas libres en el equilibrio respectivamente y (R - PM) la concentración del complejo de ambos. Tenemos, aplicando los datos de: eficiencia de contador = 33 % y actividad específica de ( $^3H$ ) PM =  $10^3$  mc/mM.

	<u>cpm/0.1 ml</u>	<u>( M )</u>
( PM )	125.000	$6 \times 10^{-7}$
( R - PM )	3.700	$10^{-8}$
( R ) = ( R ) <sub>T</sub> - ( R - PM )		$= 4,7 \times 10^{-6}$
Se deduce $K_d \text{ } 0^\circ\text{C} = 2,85 \times 10^{-4} \text{ M}$		

Estos resultados concuerdan con los de inhibición de fijación de ( $^{14}C$ ) CM y ( $^{14}C$ ) LM por PM en que también existe competición parcial indicando un solapamiento entre los sitios de fijación de CM o LM con el de PM.

El que ER estimule fijación de PM puede tener relación con el estímulo que produce en formación de enlace peptídico (Cerná, Rychlik y

Pulkrabek 1969). (Teraoka y Tanaka 1971). Como se verá en el capítulo IV, PM tiene un pequeño efecto inhibitor en fijación de ER, este efecto opuesto podría explicarse si ER produjera al fijarse un cambio conformacional en el ribosoma que favoreciese la fijación de PM, según se discutirá en el capítulo IV.

Esparsomicina, antibiótico inhibidor de formación de enlace peptídico (Monro y Vázquez, 1967) se ha indicado es inhibidor competitivo puro con respecto a PM en reacción de polilisil-tRNA fijado a ribosomas con PM (Goldberg y Mitsugi 1967) y de esta con N-acetil-fenilalanil-tRNA (Pestka 1970). Por otro lado, esparsomicina inhibe fijación enzimática de aminoacil-tRNA (Ravel, Shorey y Shive, 1970). Este resultado de que esparsomicina inhiba totalmente la fijación de PM detectada por nosotros, da una prueba directa de la interacción de esparsomicina con el sitio aceptor de peptidiltransferasa del ribosoma.

#### ESTUDIO CINETICO SOBRE REACCION DE FRAGMENTO ( CACCA-Leu-Ac ) CON PUROMICINA.

Se comenzó por hacer una aproximación al conocimiento del mecanismo de esta reacción, como paso previo para poder interpretar el significado de los datos obtenidos con la cinética de la misma. Como se indicó en la introducción, la ventaja que se esperaba encontrar -

en este sistema cinético es la simplicidad de ambos sustratos, CACCA-Leu-Ac y PM que evita gran parte de las interacciones distintas de las que tienen con peptidiltransferasa, tanto aminoacil, como peptidil-tRNA.

En principio se trata de una reacción de dos sustratos, CACCA-Leu-Ac y PM, que reaccionan para dar los productos Ac-Leu-PM y CACCA. Sin embargo se ha sugerido por Silverstein (1969) que etanol podría actuar como sustrato intermediario aceptando Ac-Leu que se esterificaría con aquel (Scolnick, Tompkins, Caskey y Nirenberg 1968) y del éster formándose transferiría a PM para dar Ac-Leu-PM. Los hechos en que se basa para hacer esta hipótesis son: Los distintos disolventes empleados que producen la reacción de fragmento todos llevan oxígeno en forma de hidroxilo o cetónico capaz de dar este por tautomería cetoenólica. Los ribosomas pueden catalizar la transferencia de Acetil aminoacil de tRNA a hidroxipuromicina (derivado de puromicina que tiene un OH en lugar de  $\text{NH}_2$ ) por un enzima que se comporte como peptidiltransferasa y por ello se cree es el mismo centro activo del ribosoma. (Fahnestock, Neumann, Shashova y Rich 1970).

Para nosotros, sin embargo etanol no desempeña esta función debido a los siguientes hechos: El requerimiento de etanol no es absoluto, ya que en su ausencia hay reacción, aunque con mucha mayor lentitud. Acetona, aun teniendo solamente un  $2.5 \times 10^{-4}\%$  de forma enóli



ca en solución acuosa, la estimula aunque en menor proporción (Monro y colaboradores 1969). Etanol estimula la fijación de CACCA-Leu-Ac - al ribosoma (Celma, Tesis doctoral).

Esto como la forma de las representaciones lineales a partir de los resultados de velocidades iniciales nos inclinan a considerar la reacción de fragmento como bisustrato, en la que etanol es un activador que la estimula por aumentar la afinidad del sustrato CACCA-Leu-Ac por el cambio que produce en la conformación del ribosoma, partiendo de esta base, tenemos pues una reacción enzimática que presenta - las siguientes características:

- I) En las condiciones de concentraciones de sustrato empleadas se - muestra como irreversible, ya que en el equilibrio, prácticamente todo el CACCA-Leu-Ac, sustrato en concentración limitante, ha transferido Ac-Leu a PM (Cerna, Monro y Marcker 1968)
- 2) Dada la dificultad para la obtención de cantidades suficientes de CACCA-Leu-Ac con alto grado de pureza, es difícil el emplear concen-traciones del mismo, mayores de  $10^{-6}$  M. Con esas concentraciones de CACCA-Leu-Ac, para obtener tasas cuantificables en las velocidades - iniciales es necesario el efectuar las reacciones con concentraciones de ribosomas mayores a  $10^{-7}$  M. En estas condiciones la relación de - concentración de sustrato a la de enzima (ribosoma) varía de 1 a 10 aproximadamente, no siendo en principio suficiente para poder aplicar

las ecuaciones del estado estacionario (Walter, 1966). Sin embargo - dada la desproporción entre la velocidad de reacción en el sentido - de formación de Ac-Leu-PM y la inversa de descomposición del mismo - que hace que la reacción se comporte prácticamente, en nuestras condiciones, con irreversible dicho inconveniente puede obviarse (Walter 1966). Para probarlo seguimos el criterio de Wong (1965) que dice - que pueden aplicarse ecuaciones de estado estacionario a una reacción enzimática si la velocidad inicial es proporcional a la concentración de enzima. Como se muestra en la figura III-I de experimentos en los que se emplean concentraciones de sustrato en proporción más desfavo rable respecto a la concentración de ribosomas, se cumple este reque sito.

3) Se ha observado fijación al ribosoma, de ambos sustratos por separado en las condiciones de la reacción, de CACCA-Leu-Ac por Celma (Tesis doctoral) y de PM por nosotros descrita en éste capítulo.

Con estos precedentes nos hemos propuesto el hacer una aproxima ción al mecanismo formal de esta reacción que nos permitiera interpretar el efecto de los antibióticos sobre la misma. De los tres métodos usualmente empleados para este fin, estudios de velocidad inicial, inhibición por productos y cambio isotópico, dadas las características de nuestra reacción, sólo hemos usado el primero de ellos. Nos interesaba conocer si el mecanismo es de tipo secuencial (de en-

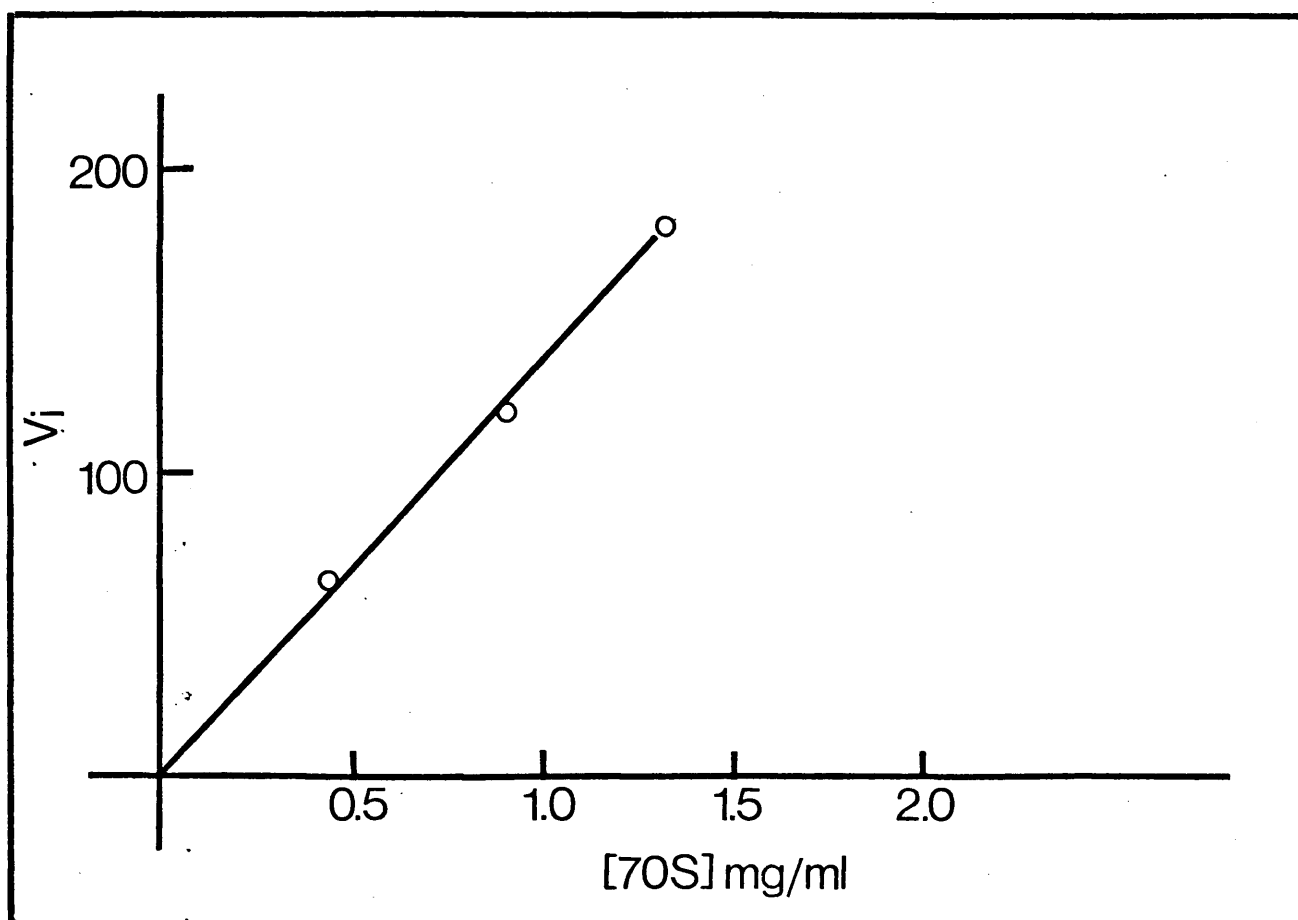


Fig. III-I. Reacción de fragmento. Variación de velocidad inicial con la concentración de ribosomas. Se tomaron muestras a tiempos cortos, 1 min. 3 min. y 5 min. y se tomó la velocidad como la tangente a la curva a tiempo 0. La concentración de PM fue de  $1.25 \times 10^{-3}$  M y CACCA ( $^{14}\text{C}$ ) Leu-Ac a aproximadamente  $10^{-7}$  M.

zima sustituido ó ping-pong) en el que primero se fija un sustrato - al ribosoma modificándose por la pérdida de una de sus partes y luego se une al otro sustrato para dar el producto, o bien transcurre mediante la formación de un complejo ternario entre ambos sustratos y el ribosoma cuya existencia es cinéticamente significativa (tipo de des hidrogensasas) o con vida tan efímera como para no intervenir en la cinética (mecanismo de Theorell-Chance).

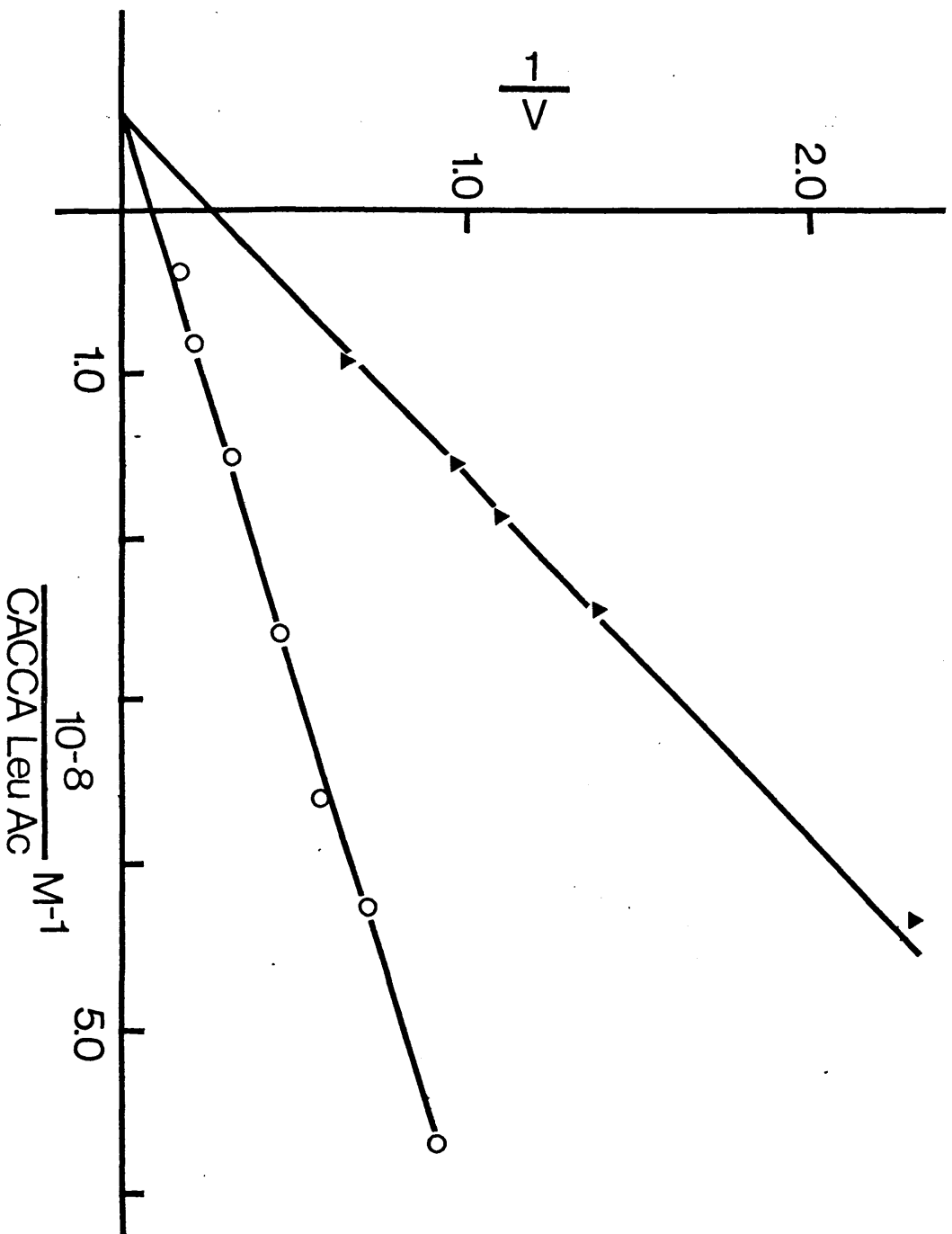
Esto nos lo indicaría con algunas restricciones que comentaremos el que las rectas obtenidas en una representación de Lineweaver-Burk de las recíprocas de velocidades iniciales en función de las de la - concentración de un sustrato variable manteniendo el otro constante, fuesen paralelas o confluyentes.

En la figura III-2 se muestran estas gráficas para distintas con centraciones de PM, constantes en cada una de las cuales se ha variado la de CACCA-Leu-Ac, mientras que en la III-3 y III-4 aparecen experimentos en los que se ha mantenido constante la concentración de - CACCA-Leu-Ac y se ha variado la de PM en cada una de las líneas.

El que tanto en la figura III-2, como en III-4 aparezcan líneas - rectas y que éstas sean confluyentes indica en principio que se trata de un mecanismo de complejo ternario. El que estas representaciones sean rectas, debe de obedecer a uno de los dos puntos siguientes: - (Dixon y Webb 1964)



Fig. III-2. Representación de Lineweaver-Burk de reacción de fragmento entre CACCA ( $^3\text{H}$ ) Leu-Ac y PM. Variación de CACCA ( $^3\text{H}$ ) Leu-Ac. La concentración de PM es  $2 \times 10^{-3}$  M (O — O) y de  $3.3 \times 10^{-4}$  (▲ — ▲). La reacción se inició añadiendo etanol y se tomaron puntos a tiempos cortos 30 seg. a 3 min., tomándose las velocidades iniciales como las tangentes a tiempo 0. La concentración de ribosomas fue de 0,5 mg/ml.



1) Existe un orden determinado en la interacción de los dos sustratos con el ribosoma, de modo que para que uno se fije correctamente ha de estar otro ya fijado, mientras que el segundo no puede fijarse por sí solo.

2) Hay interacción de ambos sustratos con el ribosoma en cualquier orden para dar el complejo ternario, pero el equilibrio entre los tres, se alcanza mucho más rápidamente que el del complejo con los productos de modo que se cumple la hipótesis de Micheelis-Menten.

La distinción entre los dos mecanismos hubiera podido hacerse de modo definitivo mediante inhibición por productos. Sin embargo, de que exista fijación específica de CACCA-Leu-Ac a ribosomas (Celma Tesis doctoral) y que hayamos encontrado fijación independientemente de PM, nos lleva a pensar que la reacción de fragmento presenta un mecanismo por complejo ternario no ordenado de equilibrio rápido, en el que éste tiene significación cinéticamente o es de vida efímera en relación a los otros estadios (mecanismo de Theorell-Chance). La distinción entre estos dos mecanismos podría hacerse por inhibición por productos o cambio isotópico.

Sin embargo, aunque muy improbable, estas curvas podrían deberse a otros mecanismos en cuyas ecuaciones quedaran anulados los términos de orden superior para las concentraciones de los sustratos.

La abscisa del punto de intersección de las rectas según Linewea

Fig. III-3. Curva de variación de velocidades iniciales de rea  
ción de fragmento con concentración de PM manteniendo constante la de  
CACCA (<sup>3</sup>H) Leu-Ac en  $4 \times 10^{-10}$  M. La concentración de ribosomas fué  
de 0.6 mg/ml. Se tomaron velocidades iniciales del modo usual.



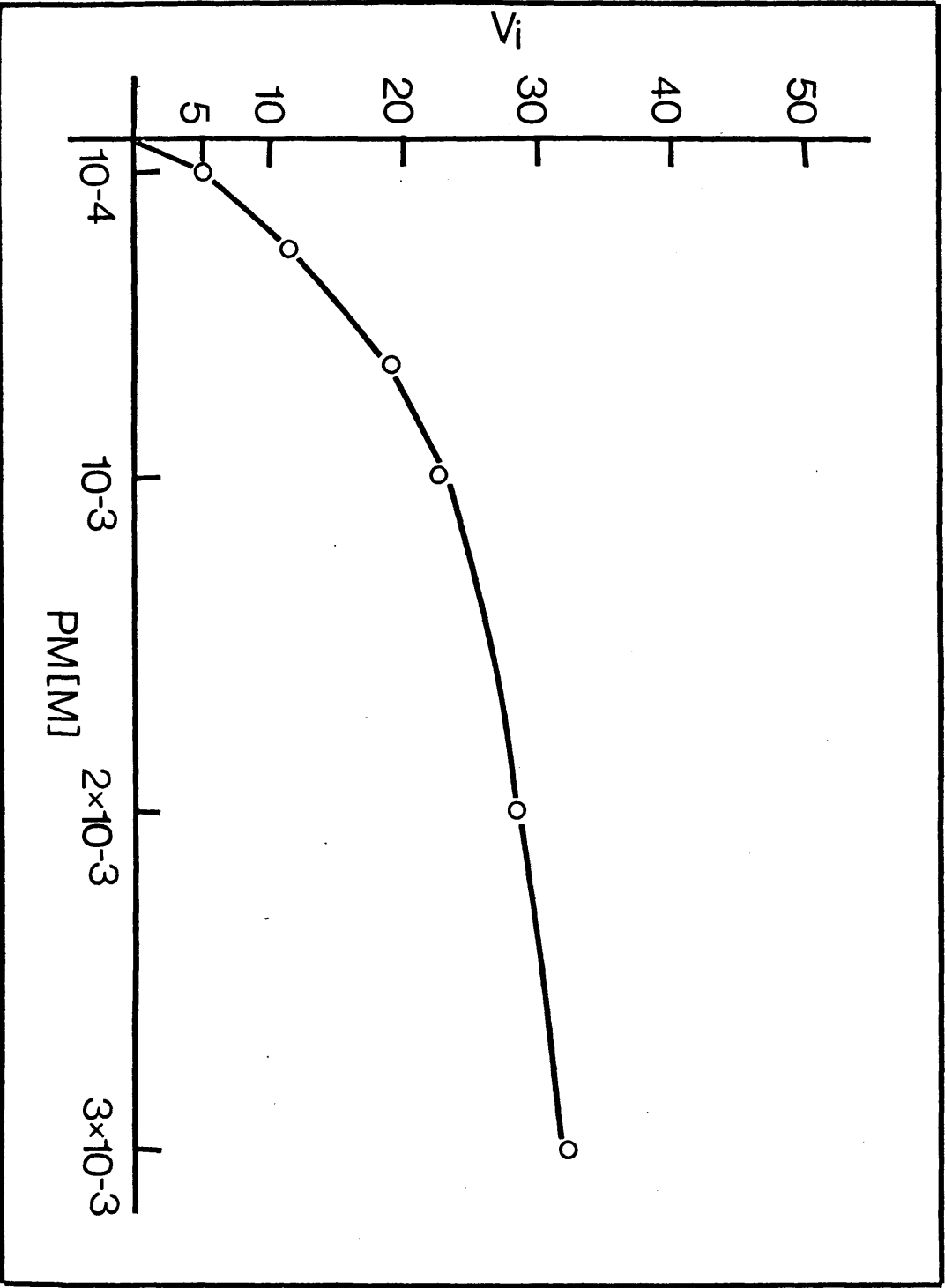
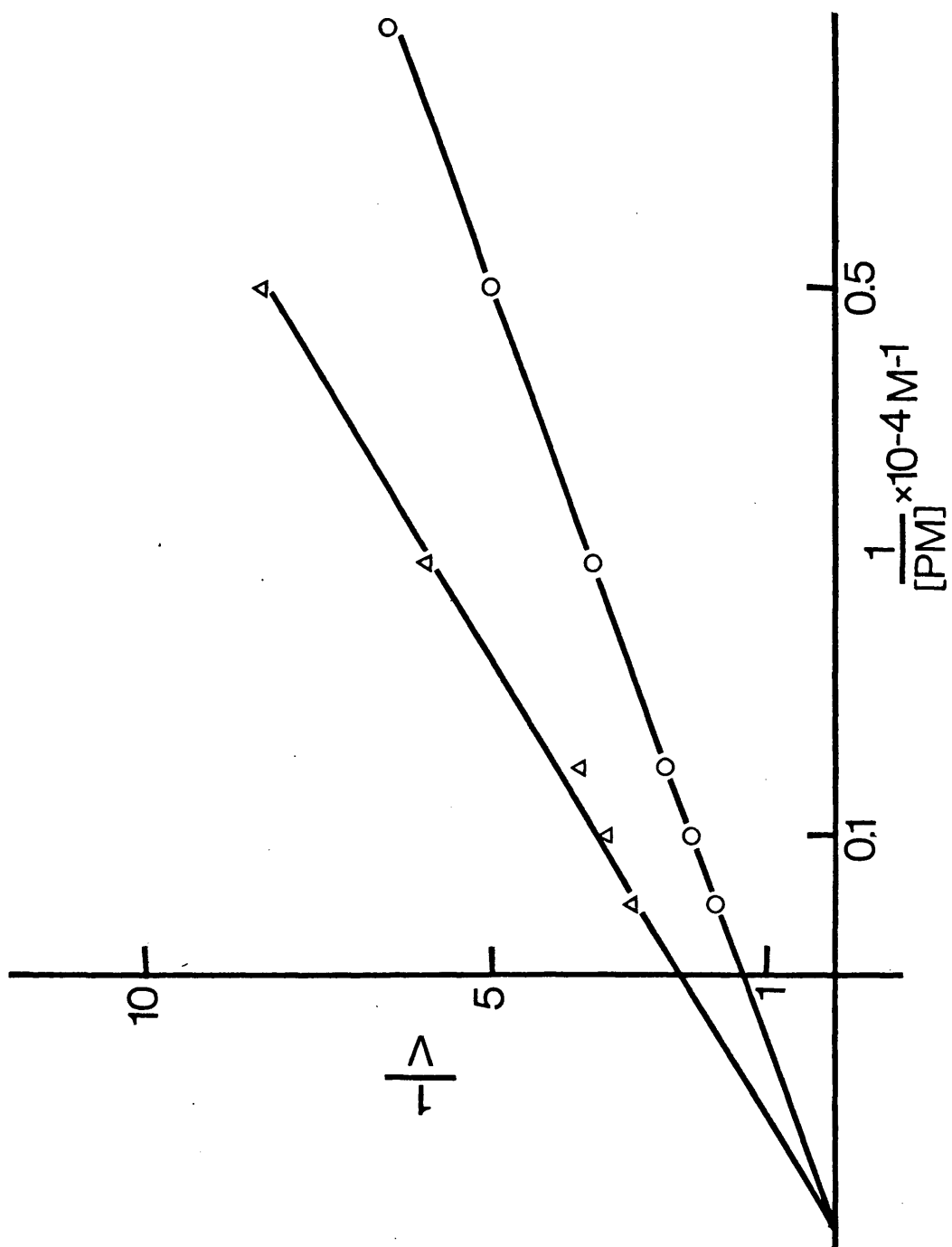


Fig. III-4. Representación de Lineweaver-Burk para reacción de fragmento entre PM y CACCA ( $^{14}\text{C}$ ) Leu-Ac. Variación de PM. Condiciones standard descritas en sección de Métodos. Las concentraciones de - CACCA ( $^{14}\text{C}$ ) Leu-Ac son de aproximadamente  $8 \times 10^{-7}$  M (O — O) y -  $6 \times 10^{-7}$  M. Concentración de ribosomas de 0.5 mg/ml.



ver-Burk es el valor de la constante de asociación del sustrato representado en abcisas sólo cuando éste es el primero en fijarse al enzima en un mecanismo ordenado. Dicho valor sería, en el caso de un mecanismo de complejo ternario desordenado de equilibrio rápido, constante de disociación cuando se representa cualquiera de los dos sustratos. Además el que este punto este sobre, a nivel o bajo el eje de abcisas significa en esas condiciones que el otro sustrato estimula, no influye o disminuye respectivamente la afinidad del fijado en segundo lugar (Frieden 1957 ).

En nuestro caso el que los puntos de intersección tanto para PM como para CACCA-Leu-Ac esten situados en el eje de abcisas como se muestra en las figuras IV-2 y 4 así como en otros experimentos no representados, parece indicar que las fijaciones de PM y CACCA-Leu-Ac al ribosoma son mutuamente independientes.

El que se obtenga con estos resultados una  $K_d$  0°C para PM de  $5.5 \times 10^{-4}$  M, similar, dentro de los márgenes de error manejados, a la obtenida por fijación directa,  $2.85 \times 10^{-4}$  M apoya el que esta fijación sea funcional así como el mecanismo propuesto.

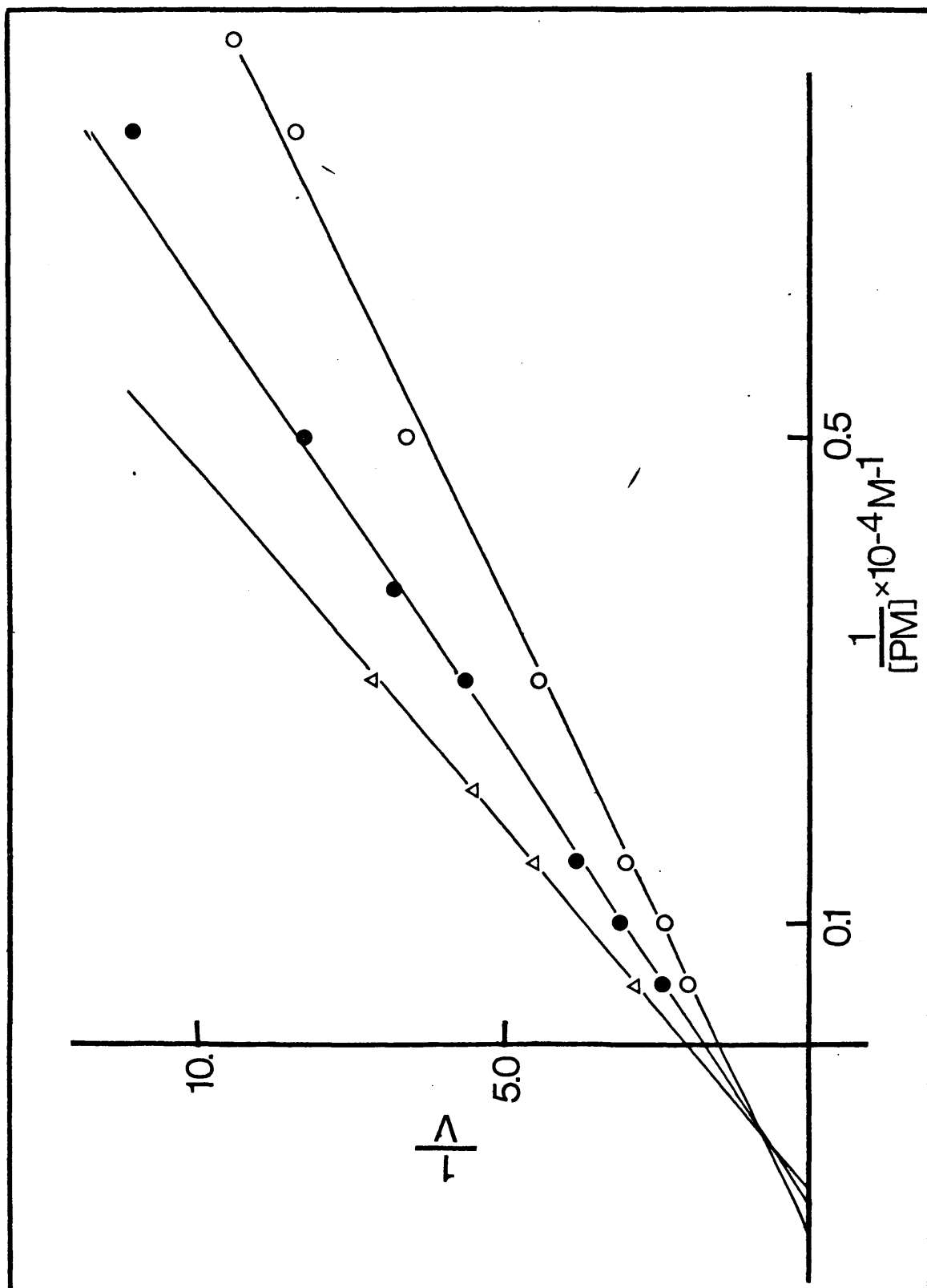
Inhibición de cloramfenicol respecto a puromicina en reacción de fragmento.

Para la determinación del tipo de inhibición que ejerce CM en -

reacción de peptidiltransferasa se han reportado datos contradictorios. Así para Coutsoegeorgopoulos (1967) es de tipo no competitivo respecto a fenilalanil-tRNA al incorporarse a polifenilalanil-tRNA en presencia de ácido poliuridílico, para Goldberg (1967) es de tipo mixto con PM en reacción de ésta con polilisil-tRNA, mientras que para Petska (1970) es competitivo puro para PM cuando reacciona con Ac-Phe-tRNA. Nosotros en vez de emplear esos sistemas que utilizan tRNA completo hemos ensayado la reacción de fragmento.

En la figura III-5 se muestra uno de los experimentos realizados tanto en ausencia como en presencia de CM a concentraciones variables que representan funciones de recíprocas velocidades iniciales frente a recíprocos de concentraciones de PM para una concentración constante de CACCA-Leu-Ac. Se observa que responde a una inhibición de tipo mixto, es decir es competitiva parcial y a la vez no competitiva parcial o total respecto a PM. Según vimos en el capítulo I CM es capaz de producir inhibición total de esta reacción fig. I (4), - lo que indica la segunda posibilidad. Por otro lado, tanto CM como PM parecen interaccionar en su fijación al ribosoma de modo que se inhiben parcialmente en ésta. Estos hechos están de acuerdo con esta competición mixta, que entonces lo sería de competitiva parcial y no competitiva total. Es decir CM interferiría parcialmente con la fijación de PM y esta fijación de PM debilitada no hace posible que el -

Fig. III-5 Efecto inhibidor de CM respecto a PM en reacción de fragmento entre CACCA ( $^{14}\text{C}$ ) Leu-Ac y PM. La concentración de CACCA- ( $^{14}\text{C}$ ) Leu-Ac es en todos los casos  $6 \times 10^{-7}$  M y la de ribosomas de - 0.5 mg/ml.



complejo que forman ribosoma, CACCA-Leu-Ac, PM y CM sea capaz de resolverse en los productos, Ac-Leu-PM y CACCA.

Estos resultados, que concuerdan con los de Goldberg (1967), si tuan de un modo funcional la interacción de CM con el sitio aceptor de peptidiltransferasa ribosómica.



## Capítulo IV

### FIJACION DE LOS MACROLIDOS: ESTUDIO DE INTERACCION DE ERITROMICINA Y ESPIRAMICINA CON RIBOSOMAS DE E. COLI.

#### Fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) eritromicina (ER).

Como se indicó en la introducción, en este trabajo se procede a caracterizar la fijación de ER a los ribosomas de E. Coli.

Al ensayarse los distintos procedimientos de fijación descritos en métodos para ER se observó que el equilibrio de diálisis, método de elección en general, tardaba largo tiempo en establecerse; hecho previsible, dado el tamaño de la molécula de ER. El tratamiento de las membranas con  $\text{Cl}_2\text{Zn}$ , abreviaba en algunas horas el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Sin embargo en ensayos de ultracentrifugación se llega al equilibrio en periodos muy cortos, imposibles de medir dado el tiempo necesario para sedimentar los ribosomas, por lo que se ha usado extensivamente este método. Probada la fijación - cualitativamente por ambos métodos, se estudió su reversibilidad mediante una prueba de dilución isotópica con ( $^{12}\text{C}$ ) ER cuyos resultados se muestran en la tabla IV - I.

Seguidamente, comprobado que en 15 minutos de incubación antes de la centrifugación de las muestras, se alcanzaba el equilibrio de

TABLA IV - I

REVERSIBILIDAD DE FIJACION DE ERITROMICINA A RIBOSOMAS DE E. COLI.

Incubación

<u>0 a 9 horas</u>	<u>9 horas a 18 horas</u>	<u>CPM Fijadas</u>
---	( <sup>14</sup> C) ER	400
( <sup>14</sup> C) ER	( <sup>14</sup> C) ER	390
( <sup>14</sup> C) ER	( <sup>14</sup> C) ER ( <sup>12</sup> C) ER	35

Muestras de 0.200 ml se incubaron a 0°C conteniendo en las condiciones salinas normales, ribosomas a una concentración de 5 mg/ml, (<sup>14</sup>C) ER a  $1,25 \times 10^{-6}$  M, y (<sup>12</sup>C) ER a  $1,25 \times 10^{-3}$  M cuando se indica. Al final de la incubación se centrifugaron las muestras 4 horas a 150.000 g. tomándose 0.075 ml de sobrenadante por tubo para contar radioactividad.

fijación, se procedió, empleando este método a trazar la curva de saturación de una cantidad constante de ribosomas con otras crecientes de antibiótico. Según se puede observar en la figura IV - I, los ribosomas se saturan cuando una molécula de ER se ha fijado por partícula ribosómica. También puede apreciarse en la misma, que la curva en vez de tener la forma hiperbólica, que correspondía a una fijación en la que la de unas moléculas de ER no influiría en la de otras, presenta una forma sigmoide, que se repite en otros experimentos de di-

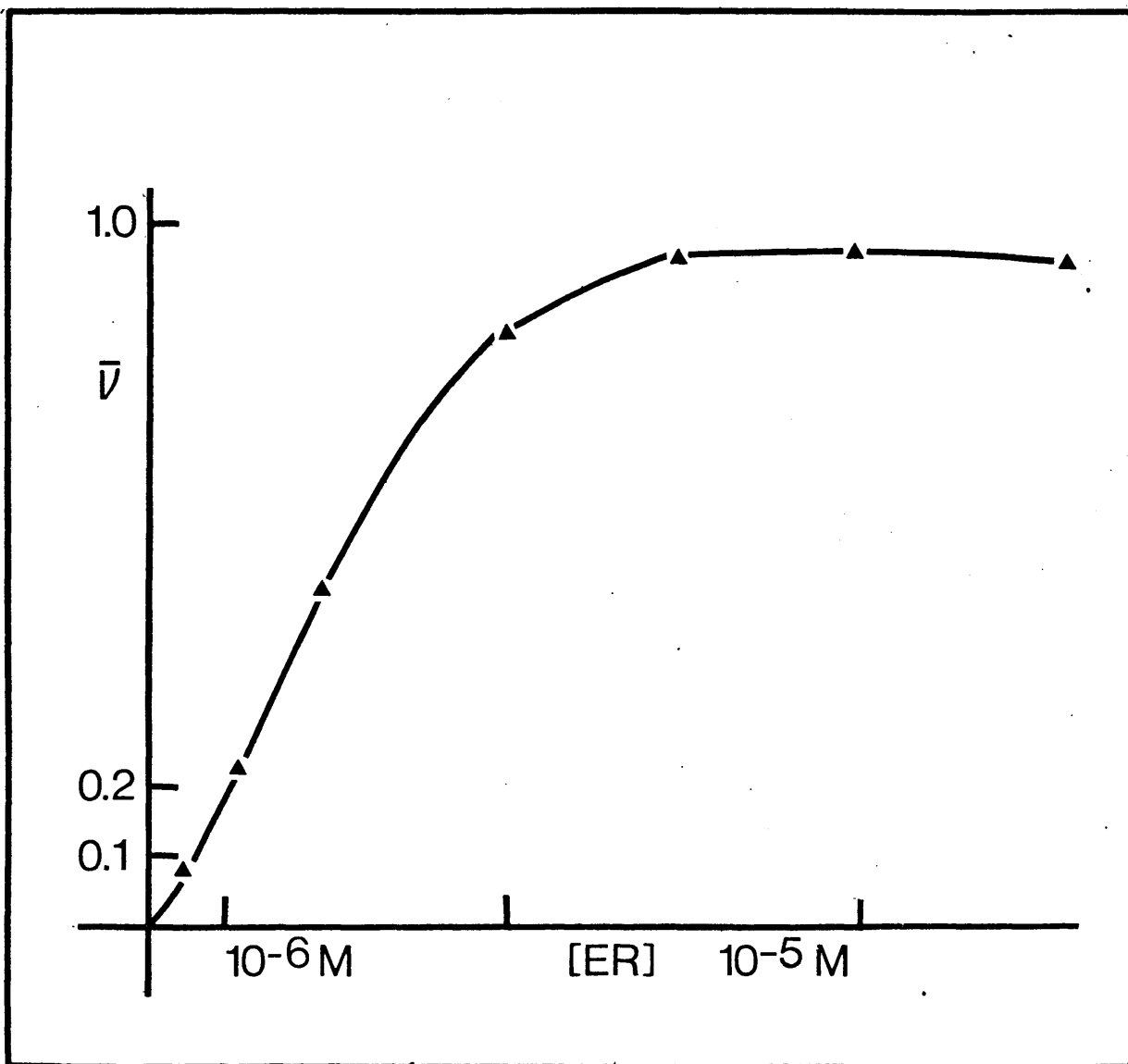


Figura IV-1. Curva de saturación de ribosomas 70 S de *E. coli* con  $(^{14}\text{C})$  ER. Experimento de fijación hecho por ultracentrifugación midiendo radioactividad en solución. La concentración era de 6.7 mg por ml y la concentración de  $(^{14}\text{C})$  ER varió desde  $5 \times 10^{-7}$  M a  $10^{-5}$  M. Tiempo de incubación 30 min. a  $0^\circ\text{C}$ .

lisis y ultracentrifugación. Es sabido que curvas de fijación de este tipo, así como las correspondientes de tipo cinético entre concentración de un sustrato y velocidad de reacción, son indicación de efectos cooperativos entre las moléculas del ligando o bien entre las del sustrato, fenómeno conocido como alosterismo.

Llevando a cabo experimentos de fijación por ultracentrifugación y diálisis se hicieron representaciones de Scatchard, que muestran - (figura IV-2y3 ) como era de esperar por la curva de saturación la forma característica de las de fijación de ligandos con efectos cooperativos. (Changeux, Gerhart y Schachman, 1968). Este mismo tipo de curva ha encontrado Corcoran (1969) en la fijación de ER a ribosomas de B. Subtilis.

Como se sabe, las teorías para explicar las curvas de saturación y las formalmente iguales de cinética, de tipo sigmoide formuladas por Monod, Wyman y Changeux (1965) y Koshland, Nemethy y Filmer (1966) entre otros, suponen la presencia de varias subunidades en la macromolécula o el enzima, a cada una de las cuales puede unirse el ligando o sustrato. Efectivamente enzimas que dan curvas de fijación de esta forma tal como asparto transcarbomilasa para ATP, presenta cuatro subunidades a las que pueden unirse otras tantas moléculas de ATP (Changeux, Gerhart y Schachman, 1968).

En el caso del ribosoma sustancialmente se fija una molécula -

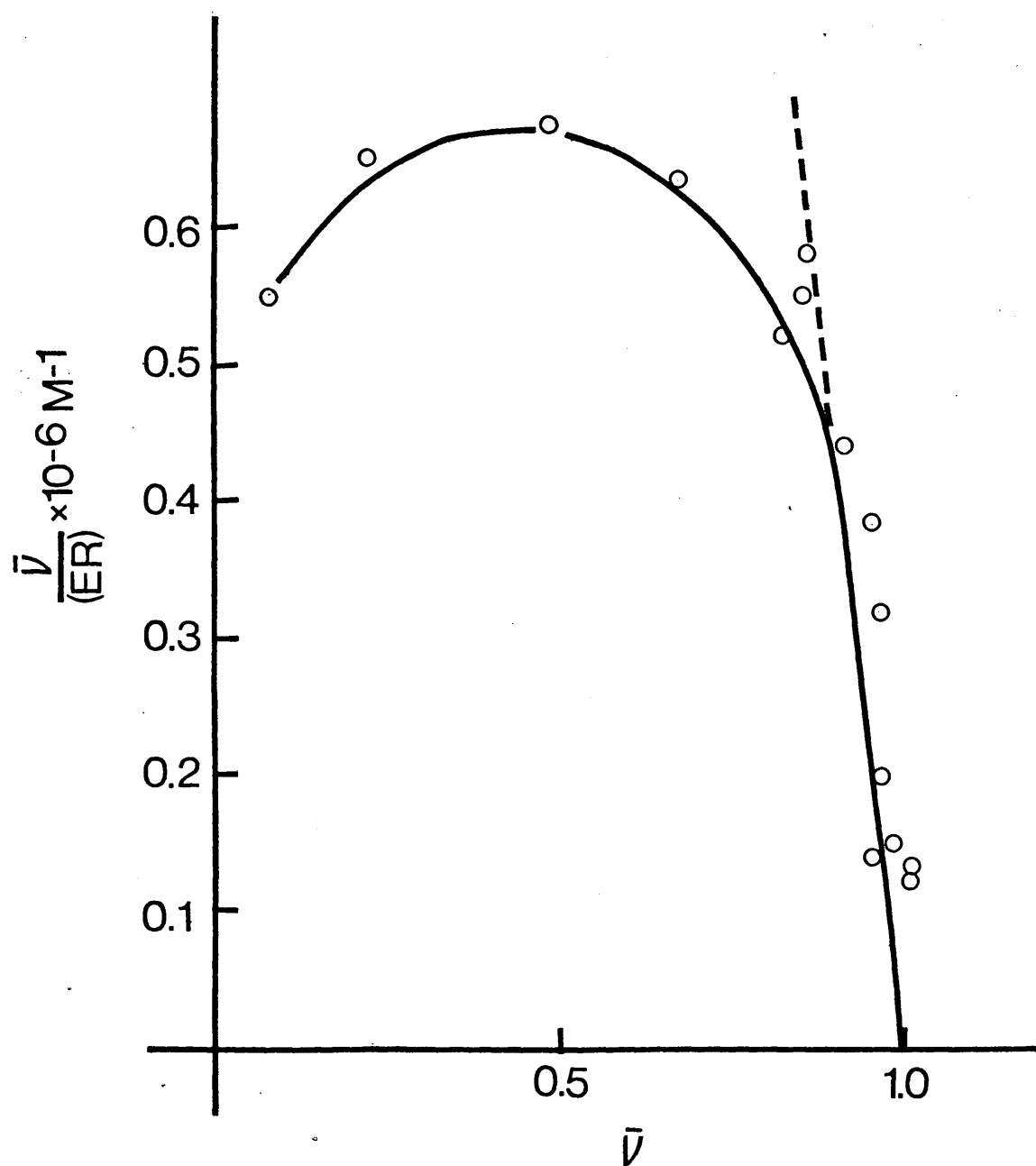


Fig. IV-2 Representación de Scatchard para fijación de ( $^{14}C$ ) ER a ribosomas de E. Coli a 0°C en condiciones iónicas standard determinada por el método de ultracentrifugación tomando solución. La concentración de ribosomas era de 6,5 mg/ml y las concentraciones de ( $^{14}C$ ) ER estuvieron comprendidas entre  $1.5 \times 10^{-7} M$  y  $10^{-5} M$ .

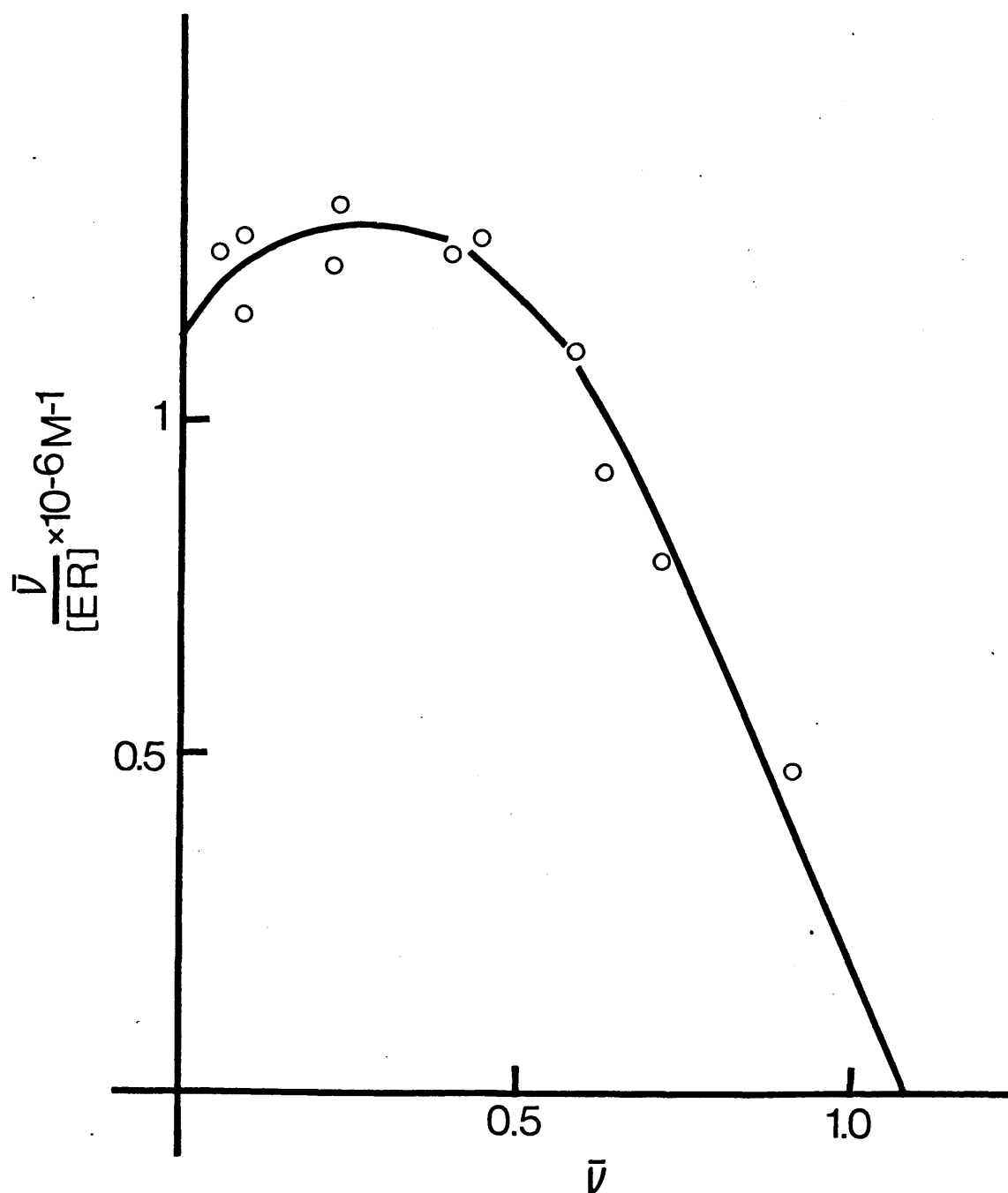


Fig. IV-3 Representación de Scatchard para fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) ER a ribosomas de E. Coli en las mismas condiciones que en figura 2 determinada por el método de diálisis en bolsas. Se incubaron muestras de solución standard con 9.7 mg/ml frente a concentraciones de ( $^{14}\text{C}$ ) ER comprendidas entre  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$  y  $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ , durante 78 horas con ligera agitación.

de ER por cada uno de estos, concretamente a la subunidad 50S. Sin embargo por otro lado se ha observado en B. Subtilis una pequeña fijación a la subunidad 30S (Oleinick y Corcoran 1969), que podría ser responsable de algún efecto cooperativo en la fijación a 70S. Con ánimo de probar esta hipótesis se aislaron subunidades 50S de E. Coli que al ser utilizadas para representar un gráfico de Scatchard dieron una forma similar al obtenido con 70S, aunque con un número de fijación de 0.6 moléculas por ribosoma. La misma forma obtuvieron para fijación de ER a 50S de B. Subtilis Oleinick y Corcoran (1969).

El hecho de que la isoterma, según la representación de Scatchard presente las características indicadas cuando se ha hecho a partir de datos de experimentos de fijación por ultracentrifugación, tanto en las experiencias de Corcoran como en las nuestras, puede sugerir que sea esta forma resultado de alguna perturbación introducida por el método. Esto podría explicar que la representación de Scatchard para ER a ribosomas de Staphylococcus aureus obtenida de experiencias de diálisis y filtración tenga la forma lineal (Mao y Putterman 1969). Sin embargo de nuestras experiencias en fijación de CM usando el método de ultracentrifugación parece desprenderse, que no es la forma convexa de la representación de Scatchard una característica de este método. El que se haya observado también, como veremos en este capítulo, que la representación de Scatchard para ER por el método de -

precipitación con etanol, método que como se ha visto es los capítulos III y IV da formas lineales para CM y LM, sea similar a la de ultracentrifugación, parece indicar que esta forma es peculiar de ER - para los ribosomas de E. Coli, debiéndose quizás la diferencia con S. aureus a características de los ribosomas de los distintos microorganismos.

Para confirmar que la convexidad de gráfica de Scatchard obtenida por ultracentrifugación no era debida a distorsiones introducidas por el método experimental, se procedió, a pesar del largo tiempo requerido, a ensayar la fijación por equilibrio de diálisis. Como se ve en figura IV - 3, se reproduce la forma obtenida por ultracentrifugación, e indica igualmente que existe una fijación máxima de una molécula de ER por ribosoma, en el rango de concentración de antibiótico usadas.

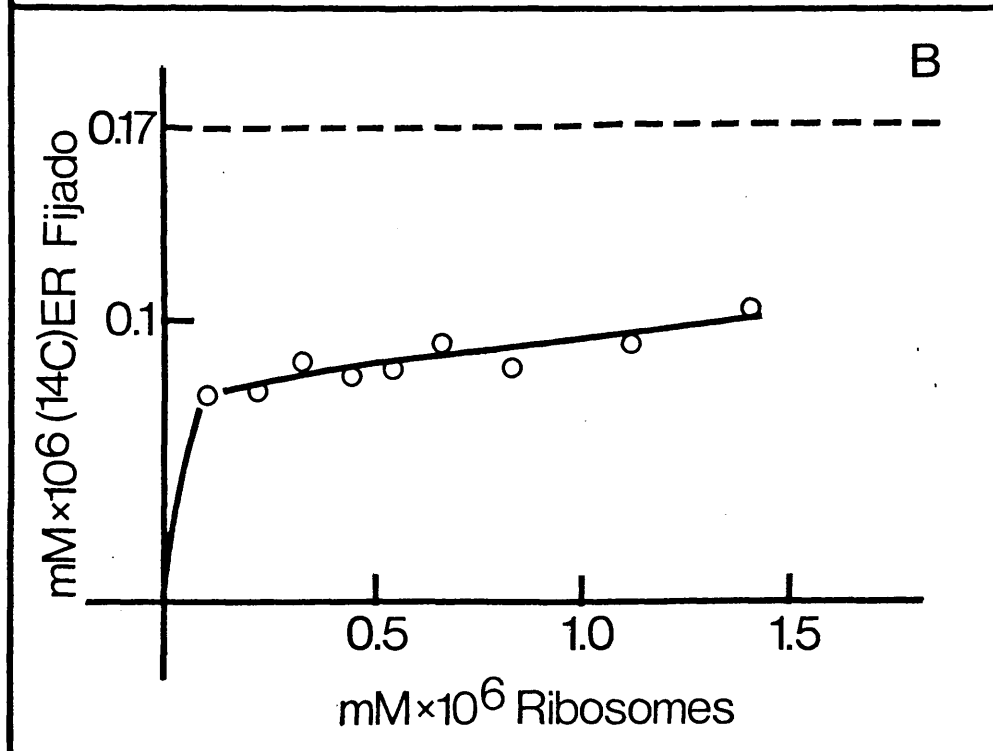
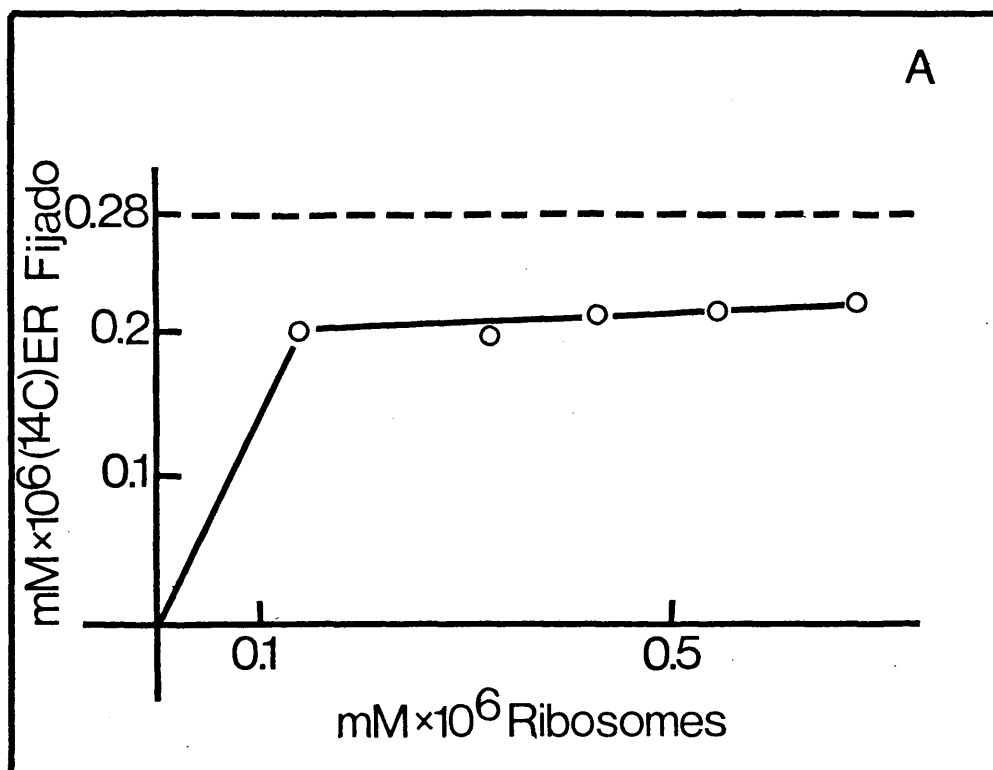
Hemos llevado a cabo a su vez experiencias de fijación de una concentración constante de ER en presencia de concentraciones crecientes de ribosomas 70S, figura IV - 4 (b). Se aprecia que la fijación tiene para las concentraciones de ribosomas menores, gran afinidad - y que al ir creciendo estas, el resto del antibiótico se fija con mucha menor afinidad. Resultado similar han obtenido Mao y Putterman - (1969) con ribosomas de S. aureus. No tenemos explicación clara para este resultado. El que la curva de Scatchard de fijación de eritromi

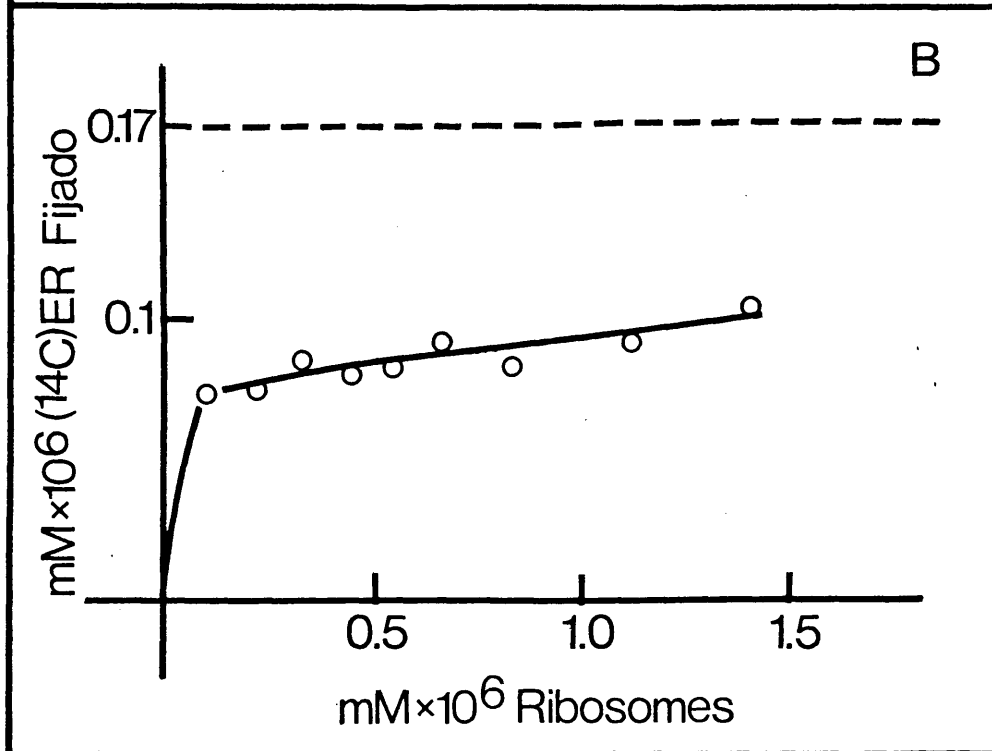
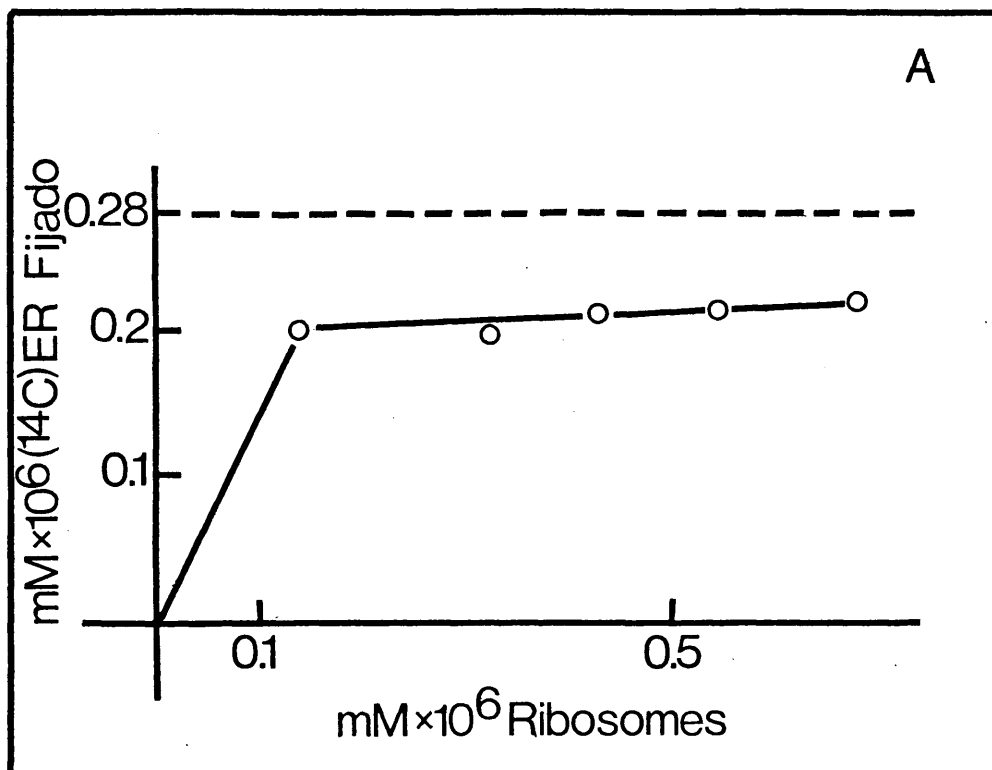


**Fig. IV-4 Saturación de ( $^{14}\text{C}$ ) ER con ribosomas de E. Coli.**

**A.-** En presencia de 33 % de etanol experimento de sedimentación en condiciones standard en el que se puso en todos los tubos 0.28 mM de ( $^{14}\text{C}$ ) ER y cantidades crecientes de ribosomas según se indica.

**B.-** En ausencia de etanol, datos de un experimento de ultracentrifugación standard en el que se puso en todos los tubos 0.17 mM de ( $^{14}\text{C}$ ) ER y ribosomas en las cantidades que se indican.





cina tenga esa forma convexa característica, no se explicaría por la existencia de posibles impurezas de afinidad nula o despreciable frente a la de ER, lo cual sólo haría variar el tamaño de la ordenada de la gráfica al afectar solamente a la concentración de ER libre y no a la saturación  $\bar{V}$ , con lo que no quedaría afectada la convexidad.

Una posible explicación sería, el que la población de ribosomas exista en dos o mas estados conformacionales en equilibrio, uno de los cuales, en proporción minoritaria, es el que fijaría ER con mucha mayor afinidad. Al fijarse ER a los ribosomas en este estado produciría en los mismos un cambio en su conformación que los sustraería del equilibrio con los que se encuentran en la configuración de menos afinidad. Así al ir aumentando la concentración de ER y el equilibrio se va desplazando hacia la preponderancia de la configuración de mas afinidad de modo que a altas saturaciones prácticamente sólo existirían ribosomas en esta forma reflejándose en la representación de Scatchard, que tomaría la forma lineal a altas saturaciones. Este cambio configuracional podrían tratarse un distinto estado de agregación entre las subunidades.

Cambios configuracionales producidos por ER en su fijación al ribosoma, han sido postulados por Teraoka y Tanaka (1970) y Teraoka (1970).

Como en los otros antibióticos estudiados ensayamos el efecto de etanol en la fijación de ER. Como veremos la afinidad aumenta con

siderablemente

Así mismo se observa un aumento en la estabilidad de la fijación que crea hasta el punto de comportarse como irreversible frente a la dilución isotópica o el efecto de su antagonista LM, tal como aparece en la tabla IV - 2.

TABLA IV - 2

ESTABILIDAD DE FIJACION DE ERITROMICINA A RIBOSOMAS DE E. COLI.

Incubación

<u>0 min a 60 min</u>	<u>60 min a 120 min</u>	<u>Fijación com</u>
—	( <sup>14</sup> C) ER	1470
( <sup>14</sup> C) ER	( <sup>14</sup> C) ER	1450
—	( <sup>14</sup> C) ER ( <sup>12</sup> C) ER	0
( <sup>14</sup> C) ER	( <sup>14</sup> C) ER ( <sup>12</sup> C) ER	1390
—	( <sup>14</sup> C) ER ( <sup>12</sup> C) LM	0
( <sup>14</sup> C) ER	( <sup>14</sup> C) ER ( <sup>12</sup> C) LM	1215

---

Volúmenes de 0.150 ml en condiciones salinas standard con una concentración de ribosomas de 5 mg/ml,  $6 \times 10^{-6}$  M para (<sup>14</sup>C)ER,  $1.3 \times 10^{-3}$  M de (<sup>12</sup>C) ER y  $2.5 \times 10^{-3}$  M para (<sup>12</sup>C) LM cuando se emplean, así como - 33% (v/v) de etanol. Se centrifugaron a 5.000 g. y se tomaron 0.1 ml - por tubo.

De los resultados de la tabla se desprende que durante todo el tiempo de incubación la capacidad fijadora de los ribosomas para ER se mantiene constante y ya hay equilibrio en el tiempo 60 minutos. - Se ha empleado ( $^{12}\text{C}$ ) LM además de ( $^{12}\text{C}$ ) ER por probar si dado el mayor tamaño de esta hubiera dificultad en su acceso a los sitios de fijación, no siendo este el caso. Así mismo ( $^{14}\text{C}$ ) ER es capaz de fijarse en igual extensión a ribosomas ya tratados con etanol como puede apreciarse en la tabla.

En fin, puede concluirse que la fijación es muy estable, teniendo a estos tiempos, el comportamiento de una fijación irreversible. De acuerdo con estos datos están los obtenidos por Mao y Putterman (1969) en fijación de ER a ribosomas de Stafilococcus aureus. Sin embargo - se descarta que se trate de una fijación por enlaces covalentes, concebibles por formación de una base de Schiff entre grupo carbonilo de su lactona con un grupo amino de RNA o proteína del ribosoma, ya que posterior diálisis sin alcohol hace desprenderse al antibiótico.

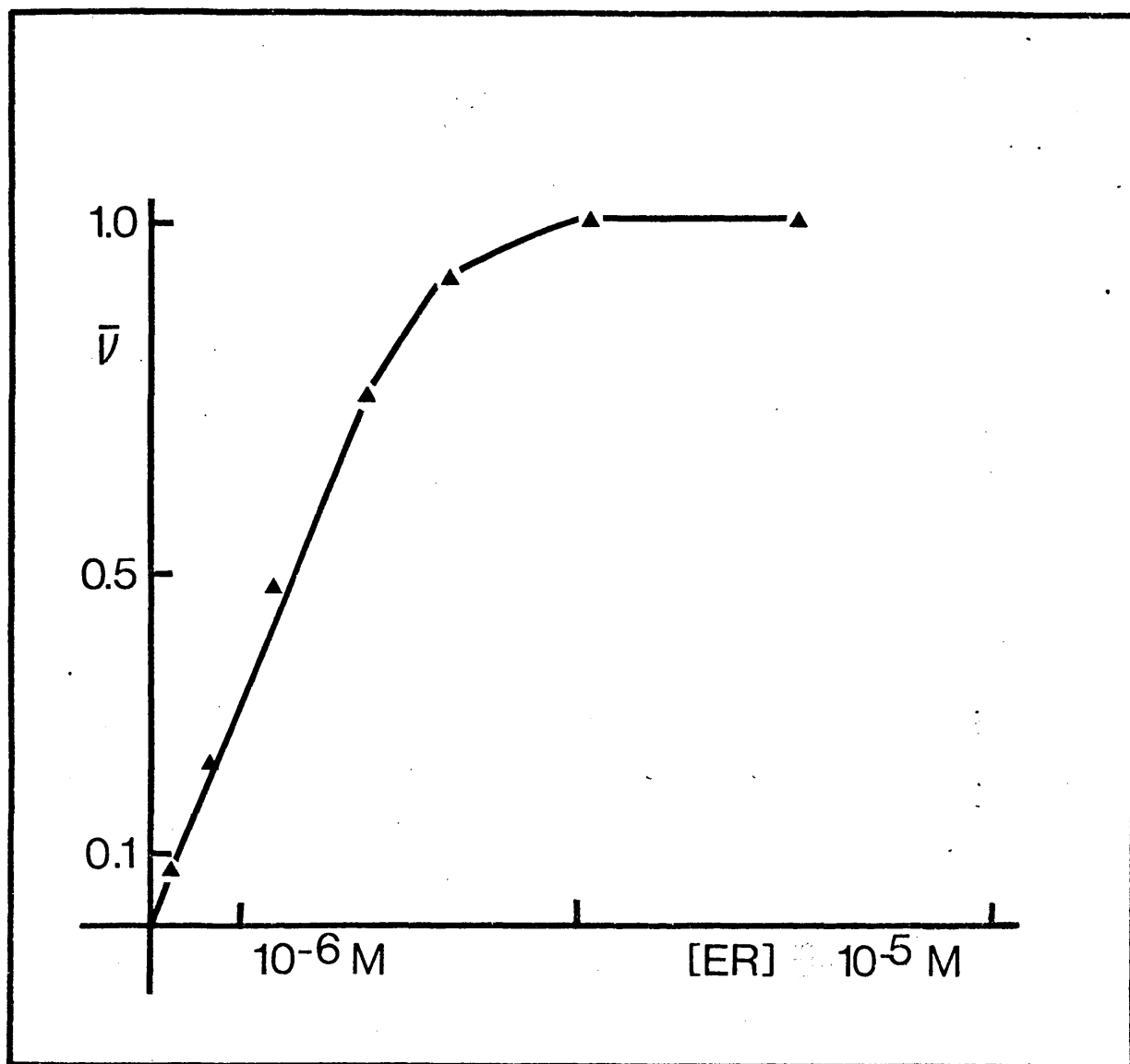
Se procedió a continuación a hacer una curva de saturación en fijación de una concentración constante de antibiótico frente a otras crecientes de ribosomas (con objeto de comprobar que toda la radioactividad de  $^{14}\text{C}$  ER correspondía a antibiótico capaz de fijación). En la figura IV - 4 (a) puede apreciarse que alcanzada una concentración de ribosomas, el aumento de fijación se hace muy pequeño de forma si-

milar a como sucede en ausencia de etanol.

Este resultado, en principio nos pareció indicar que nuestro an tibiótico contenía una proporción de impureza radioactiva no fijable sin embargo, el hecho de que del resultado análogo de Mao y Putterman (1969) con Stafilococcus Aureus en ausencia de alcohol y con ER exhaustivamente purificada, así como el obtenido por nosotros para el macrólido espiramicina nos hicieron dudar de tal hipótesis.

Con el objeto de comprobar si esta radioactividad que no se fija al aumentar la concentración de ribosomas, no lo hace debido a que se ha producido una agregación de ribosomas, por su elevada concentración, que se lo impidiera, se hizo el siguiente experimento. En el punto correspondiente a 0.65 mM de ribosomas de fig. IV - 4 (a) después de centrifugar se tomó una alícuota del líquido, se añadieron ribosomas hasta una concentración de 15 mg/ml, sales y etanol para las condiciones usuales, se incubaron 10 minutos a 0°C y se volvieron a centrifugar. La fijación no fue apreciable, lo que descarta la posibilidad de agregaciones. La curva de saturación de una concentración dada de ribosomas por concentraciones crecientes de ER se representa en la figura IV - 5, en la que se observa que hay saturación de los ribosomas cuando se fija una molécula de ER por partícula.

La representación de Scatchard para ER en presencia de etanol, aparece en la figura IV - 6. Puede observarse que presenta la misma



**Fig. IV-5 Saturación de ribosomas de *E. Coli* con ( $^{14}\text{C}$ )ER en presencia de 33 % (v/v) de etanol. Ensayo de sedimentación en condiciones standard en el que los ribosomas están a una concentración de 6 mg/ml.**



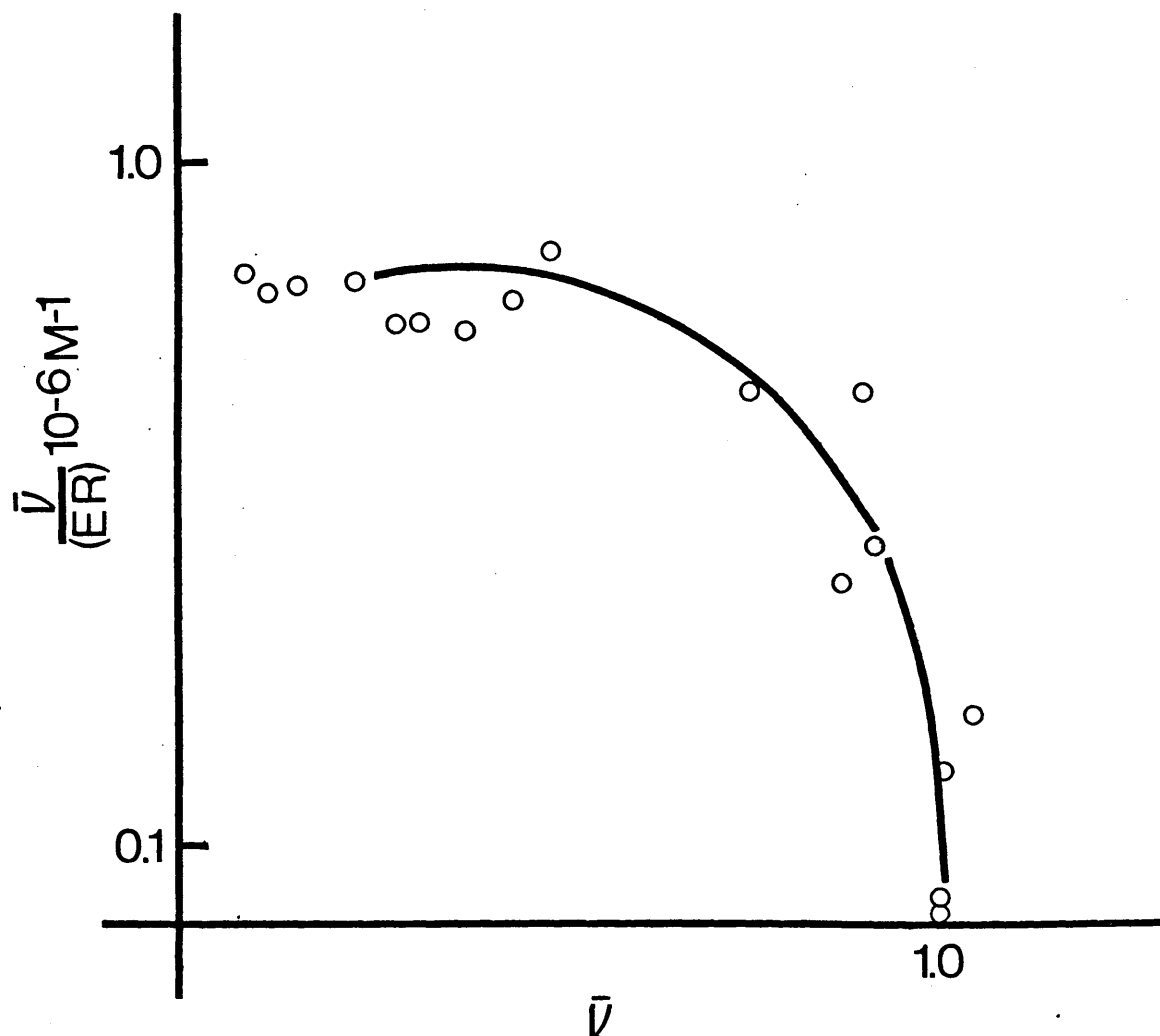


Fig. IV-6 Representación de Scatchard para fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) ER a ribosomas de E. Coli en presencia de 33 % (v/v) de etanol. Experimento de sedimentación en condiciones standard con una concentración de ribosomas de 5.5 mg/ml y de ( $^{14}\text{C}$ ) ER  $1.5 \times 10^{-7}$  M y  $2 \times 10^{-6}$  M.

forma de curva que la realizamos en ausencia de etanol. Se aprecia - claramente que ER puede fijarse hasta una molécula por ribosoma. Es difícil el calcular el valor de la constante de disociación en este tipo de curvas. Sin embargo se aprecia que ha habido un aumento de - afinidad con respecto a la realizada en ausencia de etanol.

#### Efecto de cloranfenicol en fijación de eritromicina.

Hemos estudiado la inhibición de fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) ER por CM, - tanto en ausencia de etanol (método de ultracentrifugación) como en su presencia (método de precipitación); los resultados obtenidos se muestran en la figura IV - 7, a y b respectivamente. En ambos casos se observa que concentraciones crecientes de CM reducen la fijación de ER hasta un nivel del 60 - 70% de la fijación control. En ausencia de etanol la concentración de CM necesaria para alcanzar esta inhibición es menor de  $2 \times 10^{-4}$  M, para una concentración de ER de  $2 \times 10^{-6}$  M, mientras que en presencia de etanol, se llega a ella a  $10^{-3}$  M de CM. Esto se explica porque etanol disminuye a la mitad aproximadamente la afinidad de CM y aumenta varias veces la de ER. Estos resultados sugieren que CM puede fijarse al mismo tiempo que ER a los ribosomas, de modo que ER lo hace con menor afinidad. Por otro lado el - que ER desplaza totalmente a CM en la medida que es apreciable por - nuestros métodos, parecen ser evidencia de que ER no permite fijación

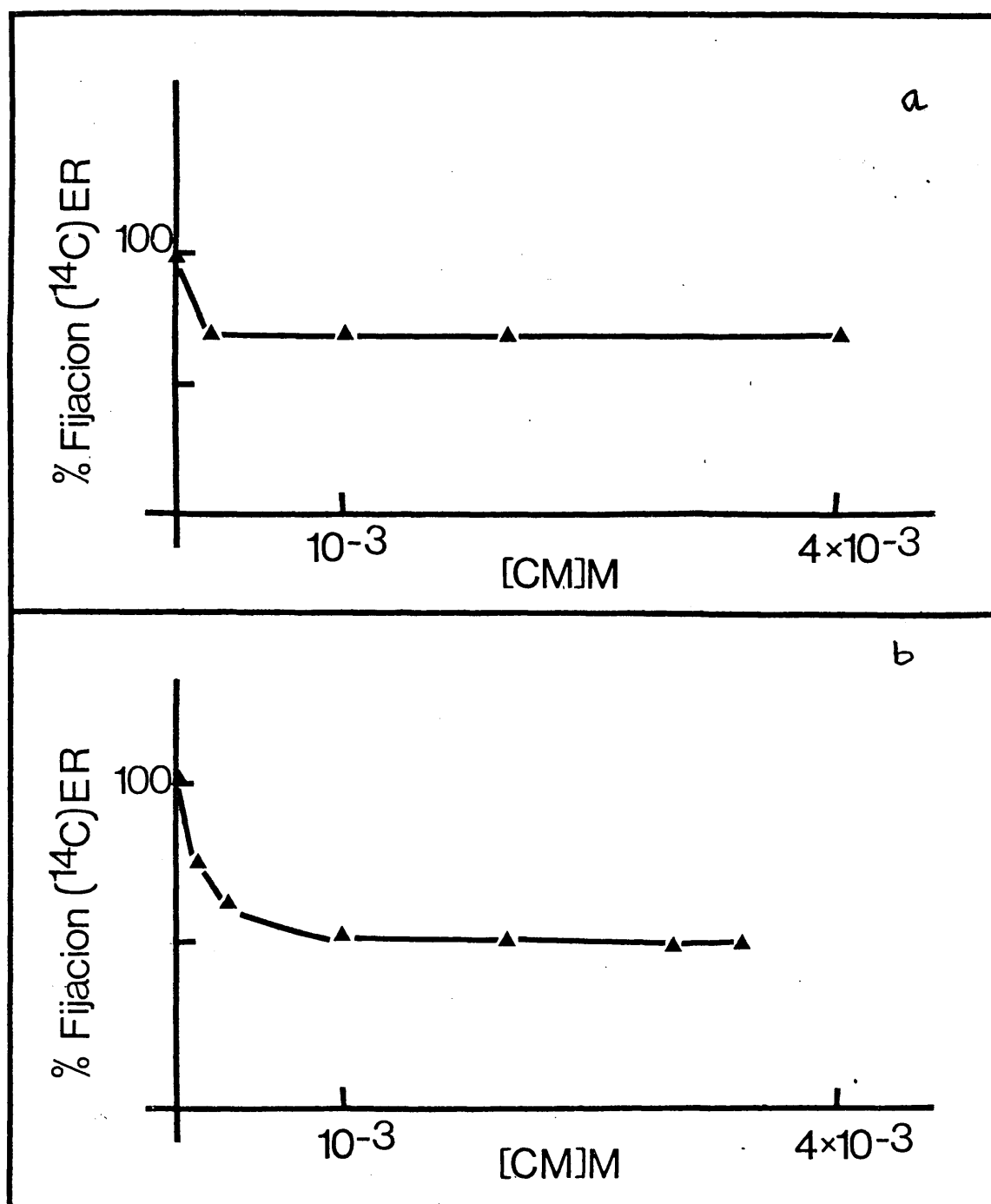


Figura IV-7 (a) Inhibición de fijación de  $(^{14}\text{C})$  ER por CM. Ensayo de ultracentrifugación con medida de radioactividad en solución. Tiempo de incubación de 60 min a  $0^\circ\text{C}$ . La concentración de ribosomas es de 6 mg por ml y la de  $(^{14}\text{C})$  ER de  $2 \times 10^{-6}\text{M}$  mientras que la de CM varió desde  $2 \times 10^{-4}\text{M}$  a  $4 \times 10^{-3}\text{M}$ .

(b) Inhibición de fijación de  $(^{14}\text{C})$  ER por CM en presencia de 33% v/v de etanol. Ensayo de sedimentación. Tiempo de incubación de 60 min a  $0^\circ\text{C}$ . La concentración de ribosomas es de 4.5 mg por ml, la de  $(^{14}\text{C})$  ER de  $3 \times 10^{-6}$  y la de CM desde  $10^{-4}\text{M}$  a  $3.5 \times 10^{-3}\text{M}$ .

de CM una vez que esta unida al ribosoma. Teniendo en cuenta el mayor tamaño de ER que probablemente se unirá por varios puntos a los ribosomas, lo cual parece desprenderse de su energía libre de fijación - calculada por nosotros que sin etanol es de - 8 a - 9 Kcal/mol; una posible explicación para interpretar nuestros resultados sería el que CM una vez fijado permitiría una fijación parcial de ER mientras que esta, una vez unida al ribosoma excluye a CM, quizás por un cambio conformacional del ribosoma. Los resultados de este trabajo están en contra de la observación de Tanaka, Teraoka, Nagira y Tamaki (1966), de que ( $^{14}\text{C}$ ) ER a una concentración de  $10^{-6}$  M no es afectado en absoluto en su fijación por concentraciones de hasta  $2 \times 10^{-4}$  M de CM, - pero quizás si hubieran subido la concentración de CM se habría obtenido la inhibición encontrada por nosotros. Oleinick y Corcoran (1968) tampoco encuentran efecto de CM en fijación de ER a ribosomas de B. Subtilis. Estos resultados junto con las experiencias con mutantes - resistentes a ER de B. Subtilis que conservan la misma susceptibilidad para CM (Oleinick, Wilhelm y Corcoran) han hecho pensar que ER y CM tienen distinto sitio de fijación. Los resultados aquí presentados - sugieren en cambio un solapamiento parcial entre ambos sitios. Los resultados de Oleinick y Corcoran posiblemente sean debidos a que - eritromicina tiene una mayor afinidad en caso de los ribosomas de - B. Subtilis ( $K_a_{0^\circ\text{C}} = 2,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) que en los de E. Coli para el -

que calculamos una  $K_a_{0^\circ C} = 3,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  diez veces menor.

#### Efecto de lincomicina sobre fijación de eritromicina.

En experimentos de fijación de ER por ultracentrifugación, en ausencia de etanol y de precipitación en presencia del mismo, según muestra la figura IV - 8 a y b respectivamente, LM desplaza totalmente a ER de su fijación a ribosomas de E. Coli apreciándose que lo hace a mucho menores concentraciones ( $10^{-3} \text{ M}$ , frente a  $2 \times 10^{-6} \text{ M}$  de  $(^{14}\text{C})$  ER en presencia de etanol), que en ausencia, ( $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) a pesar de que ER se fija con menos afinidad en estas últimas condiciones. Estos resultados no están completamente en desacuerdo con las experiencias de Teraoka y Tanaka (1969) en las que no observan decremento significativo de fijación de eritromicina a ribosomas de E. Coli a concentración de  $7 \times 10^{-6} \text{ M}$  por LM a  $1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , ya que según nuestros resultados es necesario más alta concentración de LM para obtener la inhibición. Con ribosomas de B. Subtilis, Wilhelm y Corcoran (1967) encuentran total inhibición de fijación de  $(^{14}\text{C})$  ER por LM.

Nuestros resultados de esta sección junto con los del capítulo II de fijación de LM nos permiten concluir que en E. Coli, LM y ER se fijan a sitios interaccionantes, probablemente coincidentes, excluyéndose en su fijación. Este hecho explica la reversión de la -

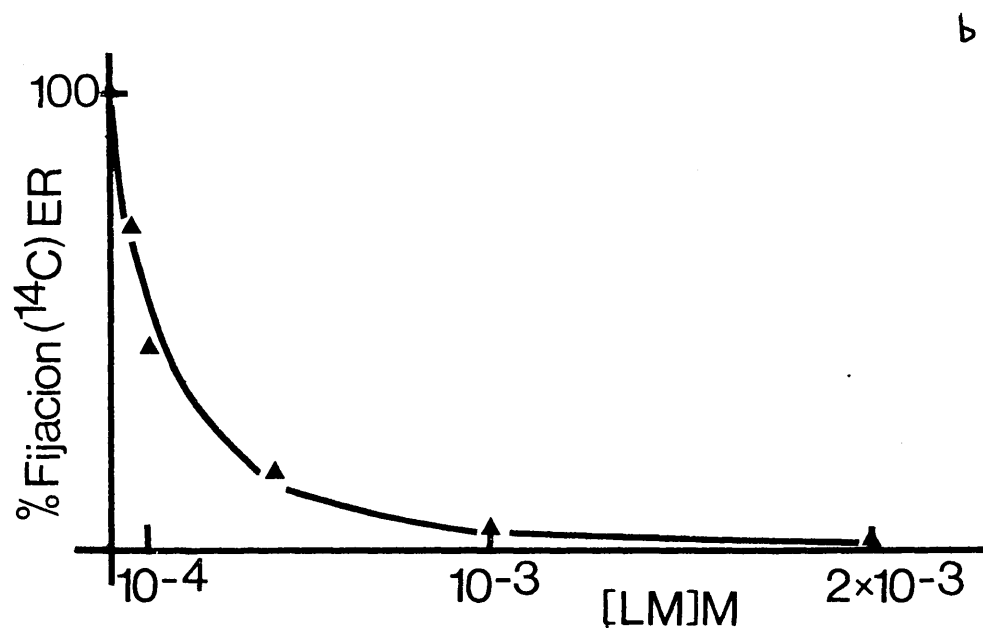
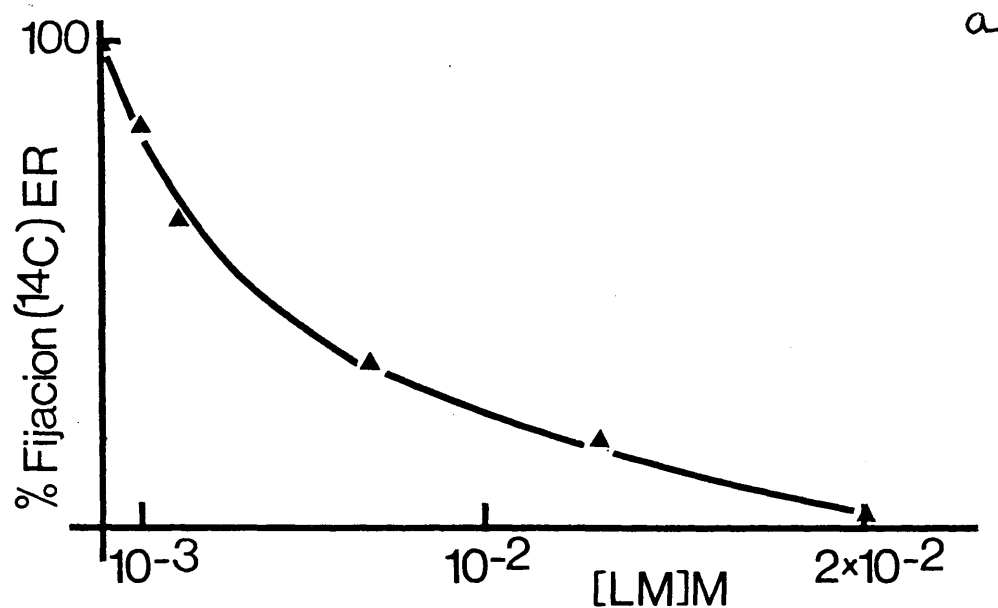


Figura IV-8. (a) Inhibición de fijación de (<sup>14</sup>C) ER por LM. Ensayo de ultracentrifugación con medida de radioactividad en solución. La concentración de ribosomas es de 7.5 mg por ml. El tiempo de incubación es de 15 min a 0° C. La concentración de (<sup>14</sup>C) ER es de 2 x 10<sup>-6</sup> M y la de LM se varió desde 10<sup>-3</sup> M a 2 x 10<sup>-2</sup> M.

(b) Inhibición de fijación de (<sup>14</sup>C) CM por LM en presencia de 33% V/V de etanol. Ensayo de sedimentación con un tiempo de incubación de 60 min a 0° C. La concentración de ribosoma es de 6 mg por ml. La de (<sup>14</sup>C) ER de 2 x 10<sup>-6</sup> M y la de LM varía desde 5 x 10<sup>-5</sup> M a 2 x 10<sup>-3</sup> M.

inhibición de LM de formación de enlace peptídico por ER, (Monro, -  
Fernández-Muñoz, Celma y Vázquez 1971), así como el antagonismo obser-  
vado in vivo entre ambos antibióticos (Barber y Waterworth, 1964).

Efecto de puromicina en fijación de eritromicina.

PM no ejerce ninguna acción sobre fijación de ER en ausencia de  
etanol tabla IV - 2.

TABLA IV - 2

EFFECTO DE PUROMICINA EN FIJACION DE ERITROMICINA

<u>Conc. de puromicina</u>	% Fijación de ( $^{14}\text{C}$ ) eritromicina	
	<u>Sin etanol</u>	<u>33% etanol</u>
0	100	100
$2,5 \times 10^{-3}$ M	95	90
$5 \times 10^{-3}$ M	95	90

En ausencia de etanol (método de ultracentrifugación) se empleó  $^{14}\text{C}$  ER a la concentración de  $10^{-6}$  M, ribosomas a 6 mg/ml. En presencia de etanol, (método de centrifugación) se utilizaron ( $^{14}\text{C}$ ) ER a  $2 \times 10^{-6}$  M y ribosomas a 5 mg/ml. Ambos ensayos se efectuaron en condiciones standard.

En presencia de etanol a las concentraciones normales, se obser

van una pequeña inhibición que se mantiene constante al aumentar la concentración de PM que no excede del 20%,. Este resultado concuerda con la falta de efecto de ER en la reacción de fragmentos con PM (Monro, Vázquez, 1967).

Efecto de una serie de inhibidores de biosíntesis de proteínas en la fijación de eritromicina a ribosomas de E. Coli.

Se han ensayado algunos de los más representativos inhibidores de síntesis de proteínas sobre fijación de ER, por el método de ultracentrifugación, los resultados se expresan en la tabla

TABLA IV 3

<u>Antibiótico añadido</u>	<u>Conc. (M)</u>	<u>% Inhibición de fijación de (<math>^{14}</math>C) ER</u>
Macrólidos:		
Espiramicina III	$10^{-4}$	80
Neoespiramicina III	$10^{-4}$	85
Forocidina III	$10^{-4}$	35
Carbomicina	$10^{-4}$	80
Oleandomicina	$10^{-4}$	33
Angolamicina	$10^{-4}$	12
Iancamicina	$10^{-4}$	2
Metimicina	$10^{-4}$	18
Chalcomicina	$10^{-4}$	7



<u>Antibiótico añadido</u>	<u>Conc. (M)</u>	<u>% Inhibición de fijación de (<sup>14</sup>C) ER</u>
Estreptogramina A	10 <sup>-4</sup>	100
Estreptogramina B	10 <sup>-4</sup>	87
Viridogriseina	10 <sup>-4</sup>	100
Amicetina	10 <sup>-4</sup>	2
Gougerotina	10 <sup>-3</sup>	5
Esparsomicina	10 <sup>-4</sup>	0
	5 x 10 <sup>-4</sup>	0
Puromicina	10 <sup>-3</sup>	5
Puromicina	5 x 10 <sup>-3</sup>	5
Siomicina	10 <sup>-4</sup>	0
Tioestrepton	10 <sup>-4</sup>	0
Celesticetina	10 <sup>-3</sup>	25
Botromicina	10 <sup>-4</sup>	11
Berninamicina	45 µg/ml	11

Los datos de esta tabla proceden de ensayos de fijación por ultracentrifugación de (<sup>14</sup>C) ER a la concentración de 10<sup>-6</sup> M. Muestras de 0.2 ml conteniendo ribosomas a una concentración de 5 a 10 mg/ml y el antibiótico competidor se pusieron sobre tubos en los que se de secó ER y el antibiótico competidor. Después de incubados 30 min. a 0°C se centrifugaron 3 h a 150.000 g y se tomó un tercio del líquido para medir su radioactividad. Se emplearon controles sin ribosomas - para conocer la cantidad fijada por diferencia.

Se observa que dentro del grupo de los macrólidos la interacción con ER es muy variada, pudiéndose decir que aquellos de menor actividad in vivo como lancamicina y metimicitina tienen un menor efecto - en la fijación de ER como se aprecia también en B. Subtilis (Oleinick y Corcoran 1969). El que espiramicina inhiba fijación de ER explica el que con ribosomas de mutantes de E. Coli B resistentes a ER, la reacción de PM sea mucho menos sensible tanto a ER como a espiramicina (Cerná y Rychlik, 1968).

Es de destacar que los antibióticos del grupo de estreptogramina A y B inhiban totalmente fijación de ER. Esto es una indicación de - proximidad de sus interacciones con 50S.

Los antibióticos nucleosídicos, esparsomicina, gougerotina, am<sub>i</sub>cetina y puromicina, no ejercen efecto sobre fijación de ER.

Siomicina y tioestrepton que interfieren en la fijación del factor G de translocación al ribosoma (Modolell, Monro y Vázquez 1971), no afectan tampoco fijación de ER, por lo cual, si como se ha postulado ER inhibiera algún paso de translocación (Igarashi, Ishitsuka y Kaji 1969) (Cundliffe y Mc Quillen 1967) no estaría relacionado con el sitio responsable de la fijación de siomicina y tioestrepton al - ribosoma.

Fijación de <sup>14</sup>C espiramicina I a ribosomas de E. Coli.

Con objeto de hacer comparativos los resultados de fijación de espiramicina con las de su inhibición en formación de enlace peptídico, para el cual empleamos la reacción de fragmentos de N-acetil-aminoacil tRNA con PM en presencia de etanol, hemos hecho los siguientes ensayos en las mismas condiciones.

Previamente hicimos experiencias de saturación de una concentración constante de antibiótico con concentraciones crecientes de ribosomas que puede verse en la figura IV - 9 . Como se puede observar - hay una fijación que aumenta casi proporcionalmente con la concentración de ribosomas mientras que a mas altas concentraciones de estos, crece muy poco. No se descarta la posibilidad de que haya una proporción de hasta un 20% de radioactividad no fijable.

En cuanto a la representación de Scatchard nos muestra que la estequiometría de la fijación es de una molécula por ribosoma. Esta parece presentar, en los ensayos realizados una convexidad para bajas saturaciones de espiramicina similar a la de ER. Esta similitud puede ser importante en cuanto al conocimiento de su mecanismo de acción, en particular en el sentido de los posibles cambios conformacionales que pudieran producir por su fijación en el ribosoma, como se discutió para ER. Fig. IV - 10.

Es de destacar la alta afinidad de espiramicina por los ribosomas de E. Coli, con  $K_d = 10^{-7}$  M, que concuerda con la estabilidad a la dilución de su complejo con ribosomas de E. Coli observada por Vázquez (1967, b).

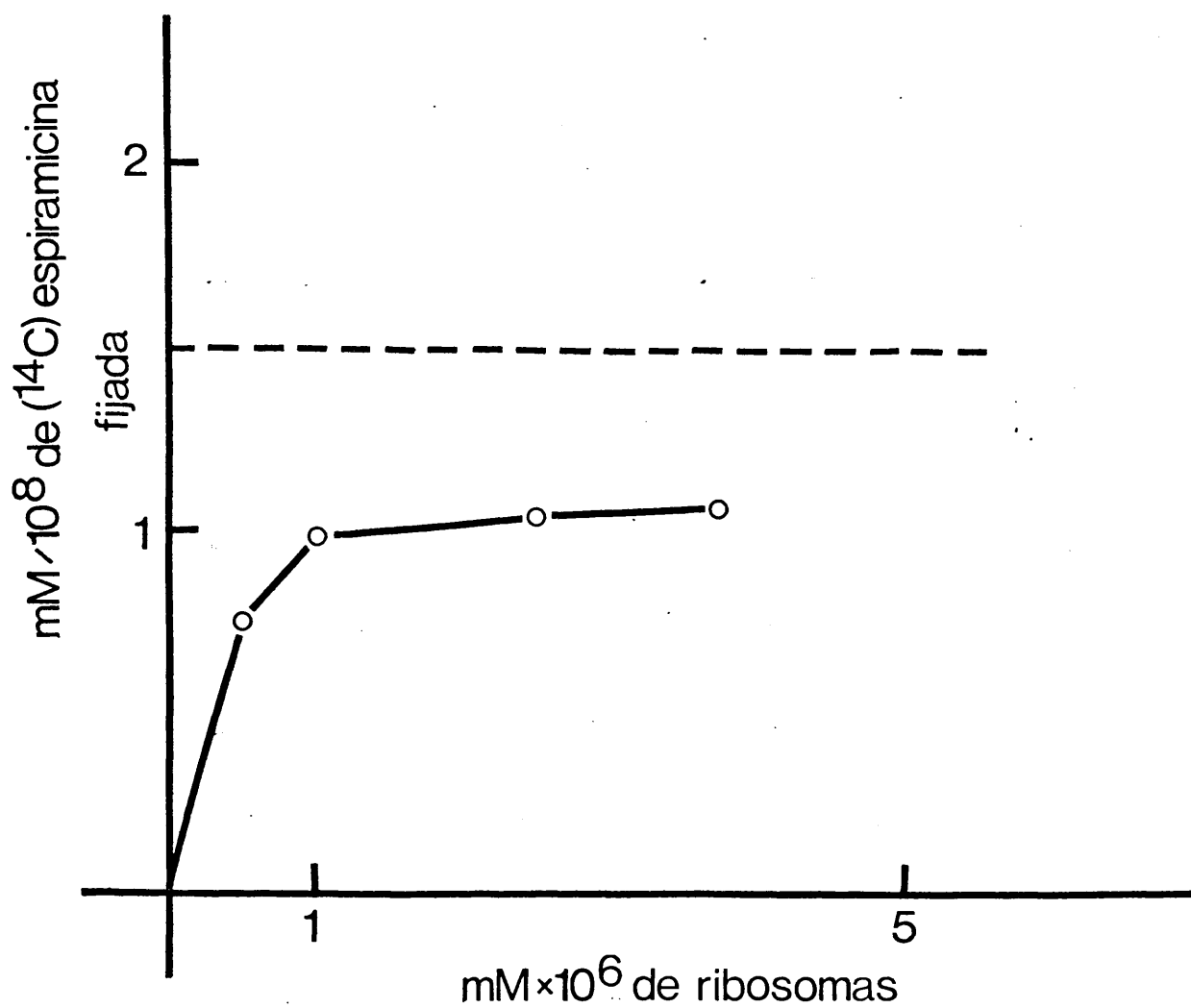


Fig. IV-9 Saturación de  $(^{14}\text{C})$  espiramicina I con ribosomas de E. Coli. Ensayo realizado en presencia de 33 % (v/v) de etanol en condiciones standard de sedimentación, se pusieron 15  $\mu\text{M}$  de  $(^{14}\text{C})$  espiramicina I y se añadieron las cantidades de ribosomas que se indican.

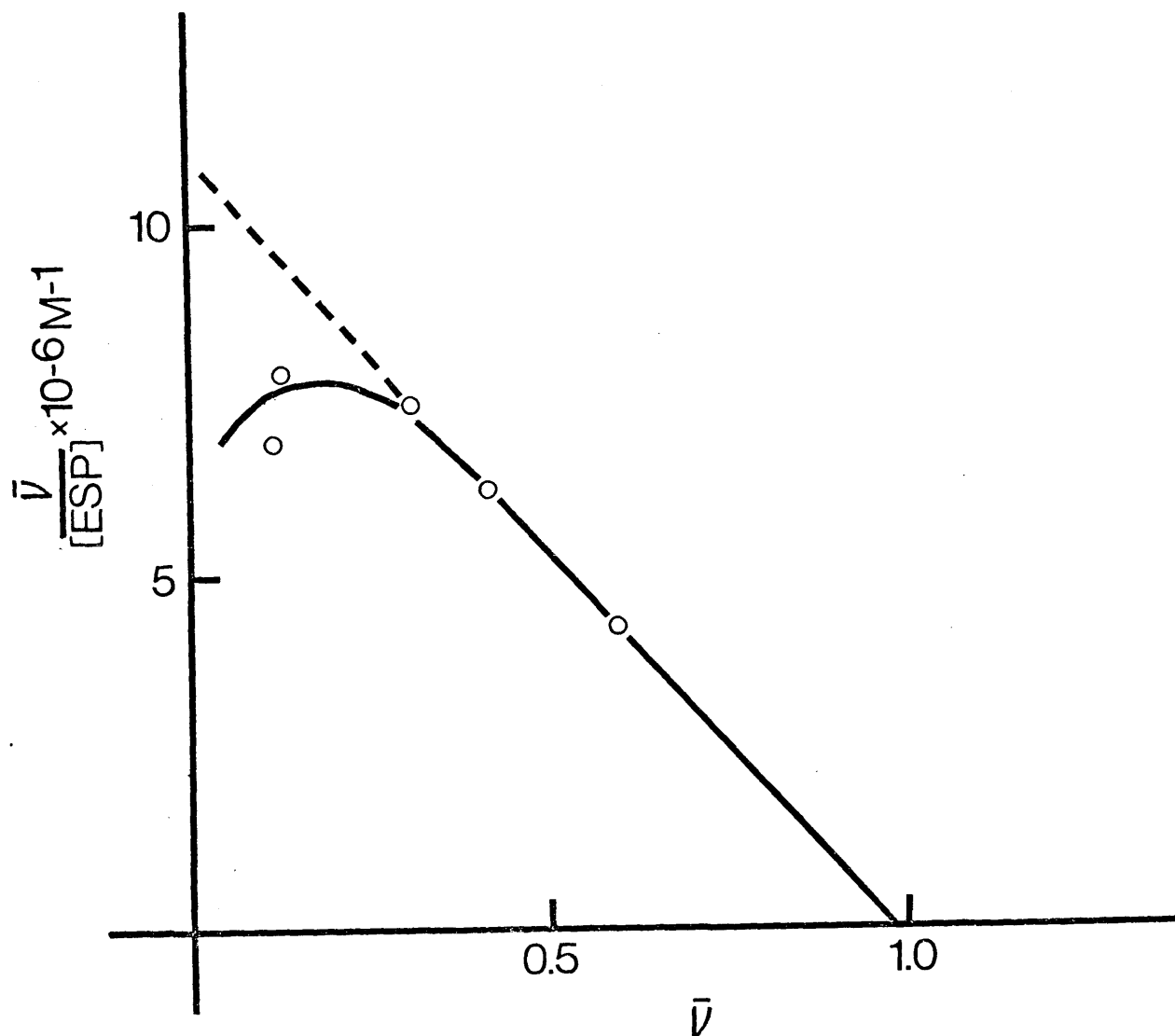


Fig IV-10 Representación de Scatchard de fijación de ( $^{14}C$ ) espi-  
ramicina I a ribosomas de E. Coli. Experimento realizado en condicio-  
nes standard en presencia de 33 % de etanol. En este experimento y en  
el anterior el volumen de reacción fue de 1.5 ml de los que se toma-  
ron 1.0 ml, al que se añadieron 5 ml de líquido de centelleo. La in-  
cubación fué de 60 min. a 0°C, la concentración de ribosomas de 0.7  
mg/ml y las de ( $^{14}C$ ) espiramicina variaron entre  $1.7 \times 10^{-8}$  M y -  
 $1.4 \times 10^{-7}$  M.

### Conclusiones

Se ha estudiado la fijación a ribosomas 70S de antibióticos inhibidores de biosíntesis de proteínas. Para ello además del uso de los métodos de ultracentrifugación y diálisis se ha modificado, haciéndolo adecuado para el estudio de esta fijación, un método de ultrafiltración a presión empleando membranas Diaflo. Con el fin de estudiar la fijación de antibióticos a ribosomas en las condiciones de reacción de fragmento, sistema simplificado para estudio de formación de enlace peptídico que se hace en presencia de etanol, se ha desarrollado un sistema de fijación en estas condiciones. El etanol no produce en los antibióticos estudiados alteración en el número de sitios de fijación, en algunos produce aumento en la afinidad, lo cual permite por otra parte el estudio comparativo de antibióticos con escasa afinidad por el ribosoma.

Se aplica un método indirecto de determinación de constantes de afinidad para fijación de antibióticos cuya interacción con el ribosoma no es posible medir directamente, que utiliza la competición con otros de fijación detectable.

Así se ha determinado que existe para cloranfenicol una fijación de afinidad homogénea con un sitio por ribosoma 70S de E. Coli, responsable de la inhibición de formación de enlace peptídico en riboso

mas e independiente de otra fijación de menor afinidad sin significación en aquella reacción. Las subunidades 50S presentan así mismo un sitio de fijación de afinidad semejante a la de 70S:  $K_d \text{ } 0^\circ\text{C} = 0,8 \pm \pm 0,2 \times 10^{-6} \text{ M}$  y  $1,0 \pm 0,2 \times 10^{-6} \text{ M}$  respectivamente,.

La presencia de etanol no modifica el número de sitios de fijación aunque hay una disminución en la afinidad en la fijación de CM a ribosomas de E. Coli, B. Subtilis y A. Montana.

Lincomicina también se fija con afinidad uniforme a un sitio del ribosoma 70S de E. Coli, B. Subtilis y A. Montana con afinidades que se correlacionan con su efecto inhibidor in vivo en estos organismos. El etanol tampoco varía el número de sitios de fijación para LM a ribosomas de distintos microorganismos aunque a diferencia que para CM produce una considerable estimulación en la fijación del antibiótico. Se estudia el efecto de distintos antibióticos análogos estructurales de lincomicina, clindamicina, celesticetina, epiclindamicina, U-24729A en síntesis de proteínas in vitro, formación de enlace peptídico y su afinidad por ribosomas de E. Coli, sugiriéndose una explicación a su distinto poder antibiótico in vivo,.

Se detecta una fijación reversible de puromicina a ribosomas de E. Coli, en ausencia y en presencia de etanol, en estas últimas condiciones con una  $K_d \text{ } 0^\circ\text{C} = 2,85 \times 10^{-6} \text{ M}$ . Esta fijación tiene significación funcional como lo muestra el que el valor de la constante de di

sociación sea del mismo orden que la determinada a partir de medidas cinéticas de la reacción de fragmento,  $K_d$  0°C =  $5,5 \times 10^{-6}$  M así como el efecto de inhibidores de formación de enlace peptídico sobre la misma. Del grupo de los macrólidos se estudia la fijación a ribosomas de E. Coli de eritromicina A y espiramicina I. Para eritromicina A encontramos una fijación reversible de una molécula por ribosoma. En presencia de etanol se mantiene esta esteoquimetría, pero la afinidad aumenta considerablemente formando un complejo que una vez formado muestra muy lenta descomposición por efecto de lincomicina. La representación de Scatchard de la isoterma de fijación de eritromicina determinada por varios métodos muestra forma parabólica a bajas saturaciones. Se discute la posibilidad de su explicación por cambios conformacionales producidos por eritromicina en el ribosoma al fijarse al mismo. En cuanto a espiramicina I, muestra también para ribosomas de E. Coli una fijación de alta afinidad de una molécula por ribosoma. Se han hecho pruebas de interacción en la fijación de estos antibióticos entre sí y con otros, representantes de los principales grupos de inhibidores de síntesis de proteínas que actúan en los ribosomas. De estos resultados son de destacar:

- Cloranfenicol y lincomicina se excluyen en su fijación, lo que indica que sus sitios de fijación se solapan.
- El mismo resultado se obtiene para eritromicina y lincomicina, lo



que explica el antagonismo observado in vivo entre estos antibióticos

- Eritromicina inhibe totalmente fijación de cloramfenicol, mientras que cloramfenicol lo hace sólo parcialmente con eritromicina. Se discute la posibilidad de un solapamiento de cloramfenicol con algunos de los distintos puntos de fijación de la molécula de eritromicina - al ribosoma.

- Estreptograminas A y B inhiben totalmente fijación de eritromicina lo cual contribuye a situar su sitio de interacción.

Se ensaya la relación de su fijación con la de puromicina, lo - que sirve para localizar los antibióticos respecto al mismo sitio - aceptor de péptidos del centro enzimático peptidiltransferasa. Puromi- cina y cloramfenicol compiten en su fijación, el primero reduce par- cialmente la fijación de éste y cloramfenicol la de aquel, esto indi- ca que CM y PM pueden fijarse simultáneamente pero con afinidades - mutuamente disminuidas.

Lincomicina presenta resultados análogos a los de cloramfenicol Puromicina por otra parte sólo inhibe escasamente fijación de eritro- micina, sin embargo éste estimula significativamente la fijación de puromicina, lo que podría explicarse por un cambio conformacional del ribosoma producido por la fijación de eritromicina.

Se inicia el estudio cinético de reacción de fragmento de acetil aminoacil-tRNA con puromicina y lo aplicamos para determinar funcio-

nalmente las interacciones de inhibidores de enlace peptídico con -  
los extremos reactivos de los sustratos de peptidiltransferasa del -  
ribosoma.

Los resultados obtenidos muestran que la cinética de esta rea-  
cción obedece a las hipótesis del estado estacionario de Haldane-  
Briggs en las condiciones aquí empleadas. Con gran probabilidad se -  
trata de una reacción que pasa por un complejo ternario de puromici-  
na, CACCA-Leu-Ac y ribosoma. ( tipo deshidrogenasas ), excluyéndose  
que se transforme un sustrato unido al ribosoma antes de que el otro  
pueda interaccionar con el enzima ( tipo transaminasas ). No se excluy  
ye que el complejo ternario sea cinéticamente no significativo por -  
su corta existencia ( mecanismo de Theorell - Chance ).

Parece desprenderse que dentro del mecanismo postulado no hay -  
un orden dado en el que puromicina y CACCA-Leu-Ac interaccionen con  
el enzima, y que se alcanza el equilibrio entre los tres mucho más -  
rápidamente que la resolución del complejo en productos. Por otra -  
parte CACCA-Leu-Ac una vez fijado al ribosoma, parece ser no influye  
en la afinidad de puromicina por el mismo.

La inhibición por cloranfenicol de esta reacción es mixta de ti  
po competitiva parcial y no competitiva total con respecto a puromi-  
cina en acuerdo con las experiencias de fijación de ambos antibióticos  
Así confirmamos de un modo funcional que cloranfenicol interacciona

con el sitio aceptor de peptidiltransferasa y que su fijación hace -  
que no sea reactivo el complejo de este enzima con sus sustratos.

## B I B L I O G R A F I A

- Allen D. y Zamecnick P.C. Biochim. Biophys. Acta 55 (1962) 865
- Barber M. y Waterworth P.M. Brit. Med. J. 2 (1964) 603
- Battaner E. Tesis doctoral en Medicina Salamanca 1971
- Blake A. y Peacocke A.R. Biopolymers 6 (1968) 1225
- Blatt W.F., Robinson S.M. y Bixler H.J. Analytical Biochem, 26 (1968) 151
- Bowers W.F. y Haschemeyer R.H. Analytical Biochem. 25 (1968) 549
- Bretscher M.S. y Marcker K.A. Nature 211 (1966) 380
- Brock T.D. y Brock M.L. Biochim. Biophys. Acta 33 (1959) 274
- Cappechi M.R., Klein H.A. Nature 226 (1970) 1029
- Caskey T., Scolnick E., Tompkins R., Goldstein J. y Milman G. Cold.  
Spr. Harb. Symp., Quant. Biol. 34 (1969) 479
- Celma M.L., Monro R.E. y Vázquez D. FEBS Letters (1970)
- Celma M.L. Tesis doctoral en Farmacia Madrid 1971
- Cerna J. y Rychlik I Biochim. Biophys. Acta 157 (1968) 436
- Cerna J., Rychlik J. y Pulkrabek P. Eur. J. Biochem. 9 (1969) 27
- Chang F.N., Sih. C. y Weisblum B. Proc. Natl. Acad. Sci. 55 (1966) 431
- Chang F.N. y Weisblum B. Biochemistry 6 (1967) 836
- Chang F.N., Siddhikol C.H. y Weisblum B. Biochim. Biophys. Acta 186  
(1969) 396
- Changeux J.P. y Rubin M.M. Biochemistry 7 (1978) 553

- Chanutin A., Ludewig S. y Masket A.V. J. Biol. Chem. 143 (1942) 737
- Capeville F. y Haenni A.L. Bull. Soc. Chim. Biol. 51 (1969) 1459
- Choi Y.S. y Carr C.H.W. J. Mol. Biol. 25 (1967) 331
- Clark J.M. y Gunther J.K. Biochim. Biophys. Acta 76 (1963) 636
- Clark J.M. y Chang A.Y., J. Biol. Chem. 240 (1965) 4734
- Colombo B., Felicetti L. y Baglioni. Biochim. Biophys. Acta 119,  
(1966) 109.
- Coutsogeorgopoulos C. Biochemistry 6 (1967) 1704
- Craig L.C. y King T.P. Methods of Biochemical Analysis X ed. D. Glick  
J. Willey y Sons New York y London 1962.
- Cundliffe E. y Mc Quillen K. J. Mol. Biol. 30 (1967) 137
- Das H.K. Goldstein A. y Kanner L.C. Mol. Pharmacol. 2 (1966) 158
- De Moss J.A. y Novelli G.D. Biochim. Biophys. Acta 18 (1955) 592
- Dixon M. y Webb E.C. in Enzymes, Longmans, London 1964
- Dowds J.E. y Riggs D.S. J. Biol. Chem. 240 (1965) 863
- Dube S. K., Rudland P.S., Clark J.M. y Marcker K.A. Cold. Spr. Harb  
Symp. Quant. Biol. 34 (1969) 161.
- Edsall J.T. y Wyman J. en Biophysical Chemistry Academic Press. New  
York y London 1958.
- Englund P.T., Huberman J.A., Jovin T.M. y Kornberg A., J. Biol. Chem.  
244 (1969) 3038
- Ennis H.L. Mol. Pharmacology 2 (1966) 444

- Ennis H.L. Biochemistry 10 (1971) 1265
- Fahnestock S., Neumann H., Shashow V. y Rich A. Biochemistry 9 -  
(1970) 2477
- Frieden C., J. Amer. Chem. Soc. 79 (1957) 1894
- Gale E.F. y Folkes S.P. Biochem. J. 53 (1953) 493
- Gilbert W. J. Mol. Biol. 6 (1963) 389
- Goldberg A. J. Mol. Biol. 15 (1966) 663
- Goldberg I.H. y Mitsugi K. Biochim. Biophys. Res. Commun 23 (1966) 453
- Goldberg I.H. y Mitsugi K. Biochemistry 6 (1967) 383
- Gottesman M.A. J. Biol. Chem. 242 (1967) 5564
- Guthrie C. y Nomura M. Nature 219 (1968) 232
- Haenni A.L. y Chapeville F. Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 135
- Hahn F.E. Experientia 24 (1968) 856
- Hanke L.J., Mason D.J., Burch M.R. y Treick R.W. Antimicrobial Agents  
Chemotherapy (1962) 565
- Hayes J.E. y Velick S.F. J. Biol. Chem. 207 (1954) 225
- Herner A.E., Goldberg I.H. y Cohen L.B. Biochemistry 8 (1969) 1335
- Herzberg M., Lelong J.C. y Revel M. J. Mol. Biol. 44 (1967) 297
- Hill W.E., Thomson J.D. y Anderegg J.W. J. Mol. Biol. 44 (1969 a) 89
- Hill W.E., Rossetti G.P. y Van Holde K.E. J. Mol. Biol. 44 (1969b) 263
- Hill W.E., Anderegg J.W. y Van Holde K.E. J. Mol. Biol. 53 (1970) 107
- Igarashi K., Ishizuka H. y Kaji A. Biochim. Biophys. Acta 37 (1969)

Ingram V.M. y Sehtton A.O.W. Biochim. Biophys. Acta 62 (1962) 456  
 Irvin J.D. y Julian G.R. FEBS Letters 2 (1970) 129  
 Jayaraman J. y Goldberg I.H. Biochemistry 7 (1968) 418  
 Jimenez A., Monro R.E, y Vázquez D., FEBS Letters 7 (1970) 103  
 Josten J.J. y Allen P.M., Biochem. Biophys. Res. Commun 14 (1964) 24  
 Julian G.R. J. Mol. Biol. 12 (1965) 9  
 Kaji A., Igarashi K, Ishitsuka H., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.  
34 (1969) 167  
 Klotz I.M., Triwush H., Iwalker F.M., J. Amer. Soc. 70 (1948) 2935  
 Koshlane D.I., Nemethy G. y Filmer D., Biochemistry 5 (1966) 365  
 Kucan Z. y Lipmann F., J. Biol. Chem. 237 (1964) 516  
 Lacks S. y Gros F. J. Mol. Biol. 1 (1959) 301  
 Leder P. Burstzyn H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 25 (1966) 233  
 Leder P., Skogerson L.E. y Roufa D. Proc. Natl. Acad. Sci. 62 (1969)  
 928.  
 Lengyel P. y Söll D. Bacteriological Reviews 33 (1969) 264  
 Levintzky A. y Koshland D.E. FEBS Symposium 19 (1969) 263  
 Lewis C. J. Parasitology 54 (1968) 169  
 Lipmann F. Science 164 (1969) 1024  
 Lodish H.F. J. Mol. Biol. 50 (1970) 689  
 Lucas Lenard J. y Lipmann F. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57 (1967)  
 1050.

- Maden B.E.H. y Monro R.E. European J. Biochem. 6 (1968) 309
- Maden B.E.H., Traut R.R. y Monro R.E. J. Mol. Biol. 35 (1968) 333
- Mangiarotti G. y Schlessinger D. J. Mol. Biol. 20 (1966) 123
- Mao J. CH. J. Bacteriol 94 (1967) 80
- Mao J. CH. y Wiegand R.C. Biochim. Biophys. Acta 157 (1968) 404
- Mao J.CH. y Robisaw E.I. Biochemistry (in press) (1971)
- Mc Conkey E.H. Method. in Enzimology XII A (1967) 620
- Miall S.H. y Walker J.O. Biochim. Biophys. Acta 145 (1967) 82
- Modolell J. Monro R.E. y Vazquez D. Nature New Biology 230 (1971) 109
- Monod J., Wyman J. y Chnageux J.P. J. Mol. Biol. 12 (1965) 88
- Monro R.E. y Vazquez D. J. Mol. Biol. 28 (1967) 161
- Monro R.E., Cerna J. y Marcker K.A. Proc. Nat. Acad. Sci. 61 (1968) 1042
- Monro R.E., Celma M.L., Vazquez D. Nature 222 (1969) 356
- Monro R.E., Fernández-Muñoz R., Celma M.L. y Vázquez D. en "Macrolide antibiotics and lincomycin" edit. S. Mitsuhashi (1971)
- Monro R.E., Staehelin T., Celma M.L. y Vazquez D. Cold. Spr. Harb Symp. Quant. Biol. 34 (1969) 357
- Monro R.E. Nature 223 (1970) 903
- Nathans D. y Lipmann F. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47 (1961) 497
- Nathans D. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51 (1964) 583
- Nathans D. J. Mol. Biol. 13 (1965) 521
- Nichols J.L. Nature 225 (1970) 147
- Nirenberg M.W. y Matthaei J.H. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47 (1961) 1588



Nirenberg M.W., Matthaei J.H. y Jones O.W. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.

48 (1962) 104

Nirenberg M.W. y Leder P. Science 145 (1964) 1399

Nomura M., Lowry C.V. y Guthrie G. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58  
(1967) 1487

Nomura M. Bacteriological Reviews 34 (1970) 228

Nobuyoshi S., Hayasi H. y Miura K. J. Biochem. 67 (1970) 373

Nye W. Analytical Biochem. 30 (1969) 309

Oleinick N. L. y Corcoran J.W. J. Biol. Chem. 244 (1969) 727

Panet A., Groot N. y Lapidot Y. European J. Biochem. 15 (1970) 223

Paulus H., Analytical Biochem. 32 (1969) 91

Petska S. Arch. Biochem. Biophys. 136 (1970) 80

Pierce J.G. y Free C.A. Biochim. Biophys. Acta 48 (1961) 436

Revel M. Greenshpan G., Herzberg H., Groner Y. y Pollack Y. 8 th. In  
tern. Congress of Biochemistry Suiza 1970

Rodriguez-Lopez M. y Vázquez D. Life Sciences 7 (1968) 327

Rodriguez-López M. y Vázquez D. FEBS Letters 2 (1970) 171

Rychlik I. Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 425

Rychlik I., Chladek S. y Zemlicka J. Biochim. Biophys. Acta 138 (1967)

640

Sabol S., Sillero M.A.G., Iwasaki K. y Ochoa S. Nature 228 (1970) 1269

Scatchard G. Ann. New York. Acad. Sci. 51 (1949) 660

Scatchard G., Coleman J.S. y Shen A.L. J. Am. Chem. Soc. 79 (1957) 12

Schachman H.K. en ultracentrifugación in Biochemistry Acad. Press.

New York, London (1961) 157

Silverstein E. Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 34 (1969) 366

Slecht L. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1965) 326

Smith J.D. Methods in Enzimology XII A (1967) 350

Speyer J.F., Lengyel P., Basilio C., Wahba A.J., Gardner R.S. y Ochoa

S. Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol. 28 (1963) 559

Spirin A.S. y Gravilova L.P. en The Ribosome Springer-Verlag, Berlin

Heidelberg New York 1969.

Steinhardt I y Beychok S. en The Proteins II edit. H. Neurath Academic

Press New York, London (1964) 139

Subramanian A.R., Davis B.D. y R.I. Beller Cold. Spring. Harb. Symp

Quant. Biol. 34 (1969) 223.

Subramanian A.R. y Davis B.D. Nature 228 (1970) 1273

Suhadolnik R.J. en Nucleoside Antibiotics ed. Willey-Interscience New

York, London, Sidney y Toronto (1970)

Simons R.H., Harris J., Clarke L.P., Wheldrake J.F. y Elliot W.M.

Biochim. Biophys. Acta 179 (1969) 248

Szer W. y Brenowitz J. Biochim. Biophys. Res. Commun 38 (1970) 1154

Takeda M. y Lipmann F. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56 (1966) 1875

Tanaka K., Teraoka H. Nagira T. y Tamaki M. Biochim. Biophys. Acta 123

(1966) 435

- Tanaka K. y Teraoka H. J. Biochem 64 (1968) 635
- Tanaka K., Watanake S. y Tamaki M. J. Antibiotics 23 (1970) 13
- Tanaka K., Teraoka H. y Tamaki M. FEBS Letters 13 (1971) 65
- Tanford C. en Physical Chemistry of Macromolécules ed. Jhon Wiley and Sons New York, London, Sidney (1961) 526
- Taubman S.B., Jones N.R., Young F.E. y Corcoran J.W. Biochim. Biophys. Acta 123 (1966) 438
- Teraoka H., Tanaka K. y Tamaki M. Biochim. Biophys. Acta 174 (1969) 776
- Teraoka H. J. Mol. Biol. 48 (1970) 511
- Teraoka H. y Tanaka K. Biochem. Biophys. Acta 232 (1971) 635
- Thach S.S. y Thach R.E. Nature 229 (1971) 219
- Tompkins R., Scolnick E. y Caskey T. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 65 (1970) 702
- Traut R.R. y Monro R.E. J. Mol. Biol. 10 (1964) 63
- Vázquez D. Nature 203 (1964) 257
- Vázquez D. Ph. D. Tesis Cambridge (1964)
- Vázquez D. Biochim. Biophys. Acta 114 (1966 a ) 277
- Vázquez D. J. gen. Microbiol. 42 (1966 b ) 93
- Vázquez D. Life Sciences 6 (1967 b ) 845
- Vazquez D. y Monro R.E. Biochim, Biophys. Acta 142 (1967) 155
- Von Ehrenstein, Methods in Enzimology XII A (1967) 589
- Vogel Z., Zamir A y Elson D. Biochem. 8 (1969) 5161

- Walter C. J. Theoretical Biol. II (1966) 181
- Watson J.D. Bull. Soc. Chim. Biol. 46 (1964) 1399
- Weber M.J. y De Moss J.A. J. Bacteriol. 97 (1969) 1099
- Wilhelm J.M., Oleinick N.L. y Corcoran J.W. Antimicrobial Agents and  
Chemotherapy (1967) 236
- Wilkinson G.N. Biochem. J. 80 (1961) 324
- Woese C. Nature 226 (1970) 817
- Wolfe A.D. y Hahn F.E. Biochim. Biophys. Acta 95 (1965) 146
- Wong J.F. J. Am. Chem. Soc. 87 (1965) 1788
- Yarmolinsky M.B. y De La Haba G.L. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 45 (1959)  
1721.
- Yukioka M. y Morisawa S., J. Biochem. 66 (1969) 241.